

Probiotika-Therapie bei Hunden mit Akutem hämorrhagischem Diarrhoesyndrom

von Anna-Lena Ziese

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Probiotika-Therapie bei Hunden mit Akutem hämorrhagischem
Diarrhoesyndrom

von Anna-Lena Ziese
aus Tübingen

München 2020

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Herrn Priv.-Doz. Dr. Stefan Unterer

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatte: Priv.-Doz. Dr. Stefan Unterer

Korreferentin: Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer

Tag der Promotion: 25. Juli 2020

Meiner Familie und meinen Freunden

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Das intestinale Mikrobiom	2
1.1.	Zusammensetzung bei gesunden Hunden	2
1.2.	Aufgaben im Wirtsorganismus.....	5
1.3.	Labordiagnostische Untersuchung	7
1.3.1.	Bakterielle Kultivierung.....	7
1.3.2.	Molekulare Methoden	8
1.3.2.1.	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	8
1.3.2.2.	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion	9
1.3.2.3.	DNA-Sequenzierung	10
1.3.2.3.1.	16S-rRNA-Amplikon-Sequenzierung.....	10
1.3.2.3.2.	Metagenomische Sequenzierung.....	11
1.4.	Abweichungen des intestinalen Mikrobioms	12
1.4.1.	Akute Enteropathien.....	13
1.4.1.1.	Die Rolle von <i>Clostridium perfringens</i> und Enterotoxin-bildenden <i>Clostridium perfringens</i> bei Akutem hämorrhagischem Diarrhoesyndrom.....	15
1.4.1.2.	Die Rolle von NetF-Toxin-bildenden <i>Clostridium perfringens</i> bei Akutem hämorrhagischem Diarrhoesyndrom	17
1.4.2.	Chronische Enteropathien	18
2.	Probiotika.....	20
2.1.	Definitionen.....	20
2.2.	Charakteristika und Anforderungen	21
2.3.	Sicherheit.....	21
2.4.	Wirkungsmechanismen	22
2.4.1.	Einfluss auf Pathogene und Toxine.....	23
2.4.2.	Modulation des Immunsystems.....	24
2.4.3.	Unterstützung der Darmbarriere.....	25
2.4.4.	Bereitstellung von Nährstoffen	26
2.4.5.	Modulation des Mikrobioms	26
2.5.	Einsatz bei gastrointestinalen Erkrankungen bei Hunden.....	27

2.5.1.	Akute Enteropathien.....	27
2.5.1.1.	Akute unkomplizierte Diarrhoe.....	27
2.5.1.2.	Parvovirose.....	30
2.5.2.	Chronische Enteropathien	30
2.5.2.1.	Futtermittel-responsive Enteropathie	30
2.5.2.2.	Antibiotika-responsive Enteropathie.....	31
2.5.2.3.	Steroid-responsive Enteropathie	31
2.5.3.	Endoparasitosen	33
2.5.4.	Antibiotika-assoziierte Nebenwirkungen	33
III.	PUBLIKATION	35
IV.	DISKUSSION	52
V.	ZUSAMMENFASSUNG	69
VI.	SUMMARY	70
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	71
VIII.	DANKSAGUNG	103

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

16S-rRNA	16S-ribosomale-Ribonukleinsäure
AHDS	Akutes hämorrhagisches Diarrhoesyndrom
<i>B. lactis</i>	<i>Bifidobacterium lactis</i> . Siehe auch <i>B. animalis</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. pseudocatenulatum</i>
bzw.	beziehungsweise
<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i> . Siehe auch <i>C. difficile</i> , <i>C. hiranonis</i>
CPE	<i>Clostridium-perfringens</i> -Enterotoxin
<i>cpe</i>	<i>Clostridium-perfringens</i> -Enterotoxin-Gen
DI	Dysbiose-Index
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dr.	Doktor
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
et al.	et alii/aliae (und andere)
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
g	Gramm
GS	Gallensäuren
GALT	gut associated lymphoid tissue (darmassoziiertes lymphatisches Gewebe)
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
KBE	Koloniebildende Einheiten
<i>L. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> . Siehe auch <i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii</i> subspecies <i>bulgaricus</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i>
<i>netF</i>	NetF-Toxin-Gen
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
Prof.	Professor
pH	Pondus hydrogenii
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RPLA	Reverse-passive-latex-agglutination
SCFA	short chain fatty acids, kurzkettige Fettsäuren
SIRS	Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
spp.	Spezies (Plural)
<i>S. thermophilus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
TGR5	G-Protein-gekoppelter Gallensäure-Rezeptor
WHO	Weltgesundheitsorganisation

I. EINLEITUNG

Probiotika sind lebende Mikroorganismen, die einen gesundheitlichen Vorteil bringen, wenn sie in ausreichender Menge verabreicht werden (WHO/FAO, 2002). Eine positive Wirkung kann unter anderem durch die Verdrängung von Pathogenen, Immunmodulation, Unterstützung der Darmbarriere und durch Nährstoffbereitstellung erfolgen (DOBSON et al., 2012; ASHRAF und SHAH, 2014; NAGPAL et al., 2018). Positive Effekte einer Probiotika-Therapie konnten bei Hunden mit unterschiedlichen gastrointestinalen Erkrankungen in vorherigen Studien beobachtet werden.

Das Akute hämorrhagische Diarrhoesyndrom (AHDS) des Hundes ist eine Erkrankung, die durch das akute Auftreten von blutigem Durchfall gekennzeichnet ist, dem in circa 80 % der Fälle Erbrechen vorausgeht (MORTIER et al., 2015). Unter symptomatischer Therapie, bei der vor allem der Ausgleich der Hypovolämie durch intravenöse Flüssigkeitssubstitution eine zentrale Rolle spielt, zeigen Patienten mit AHDS in der Regel eine schnelle klinische Besserung. Bei Patienten, die keine Anzeichen einer Sepsis haben, ist eine antibiotische Therapie nicht grundsätzlich indiziert (UNTERER et al., 2011). Die Pathophysiologie des AHDS ist derzeit nicht vollständig geklärt, aber *Clostridium (C.) perfringens*, insbesondere Enterotoxin- und NetF-Toxin-produzierende Stämme scheinen am Krankheitsprozess beteiligt zu sein (MINAMOTO et al., 2014b; UNTERER et al., 2014; GUARD et al., 2015).

Das intestinale Mikrobiom spielt als metabolisches und immunologisches Organ eine wichtige Rolle für die Gesundheit des Wirts, indem es unter anderem das Immunsystem moduliert, den Wirt vor Pathogenen schützt und Nahrungsbestandteile verstoffwechselt (BAUER et al., 2006; KAMADA et al., 2013; ROWLAND et al., 2018; TIZARD und JONES, 2018). Patienten mit AHDS weisen, verglichen mit gesunden Hunden, eine intestinale Dysbiose auf. Eine Normalisierung der intestinalen Dysbiose erscheint aufgrund der wichtigen Funktionen des Mikrobioms sinnvoll.

Ziel dieser prospektiven, placebokontrollierten, randomisierten Studie war es herauszufinden, welchen Effekt ein Probiotikum auf den klinischen Verlauf, das fäkale Mikrobiom und toxinbildende *C. perfringens* bei Hunden mit AHDS hat.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Das intestinale Mikrobiom

Als intestinales Mikrobiom bezeichnet man die Gesamtheit des Genoms aller Mikroorganismen im Darm, wozu Bakterien, Viren, Pilze und Protozoen zählen (TURNBAUGH et al., 2007; MARCHESI und RAVEL, 2015). Die intestinale Mikrobiota ist definiert als die Gemeinschaft aller Mikroorganismen im Darm (TURNBAUGH et al., 2007; JOHNSON und VERSALOVIC, 2012). Die Begriffe stammen aus dem Altgriechischen, von „mikros“ für „klein“ und „bios“ für „Leben“ ab (BANAY, 1948). Joshua Lederberg beschrieb 2001 das menschliche Mikrobiom als eine ökologische Gemeinschaft von Kommensalen, Symbionten und Pathogenen, die einen bestimmten Raum im Körper teilen und maßgeblichen Einfluss auf Gesundheit und Krankheit haben (LEDERBERG und MCCRAY, 2001).

Der Gastrointestinaltrakt von Säugetieren wird von über 100 Billionen Mikroorganismen besiedelt. Somit wird angenommen, dass die mikrobiellen Zellen, die Anzahl der Zellen des Wirtsorganismus zehnfach übersteigen (BACKHED et al., 2005; TURNBAUGH et al., 2007). Bakterien nehmen den Großteil des intestinalen Mikrobioms ein, weshalb sich die meisten Studien auf dem Gebiet des intestinalen Mikrobioms auf Bakterien konzentrieren (SWANSON et al., 2011).

1.1. Zusammensetzung bei gesunden Hunden

Die meisten Studien zum intestinalen Mikrobiom bei Säugetieren fokussieren sich aufgrund der Praktikabilität auf die Analyse des fäkalen Mikrobioms. In der Tiermedizin gibt es zudem wenige Studien, in denen auch das Mikrobiom proximaler Teile des Gastrointestinaltraktes untersucht wurde (LESER et al., 2002; MENTULA et al., 2005; SUCHODOLSKI et al., 2005; GONG et al., 2007; SUCHODOLSKI et al., 2008; XENOULIS et al., 2008; HONNEFFER et al., 2017).

Die Gesamtzahl der Bakterien unterscheidet sich zwischen verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes. So konnte mittels bakterieller Kultur festgestellt werden, dass sich im Magen 10^1 - 10^6 koloniebildende Einheiten pro Gramm Mageninhalt (KBE/g) befinden (SUCHODOLSKI, 2011). Im Dünndarm

befinden sich circa 10^2 - 10^6 KBE/g, wobei die Zahl der Bakterien im Ileum im Vergleich zu proximalen Teilen des Dünndarms höher ist (BENNO et al., 1992; MENTULA et al., 2005). Im Dickdarm sind bis zu 10^{11} KBE/g enthalten (MENTULA et al., 2005).

Die bakteriellen Phyla Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Fusobacteria und Actinobacteria machen bis zu 99 % der bakteriellen Mikrobiota im gesamten Darmtrakt gesunder Hunde aus (SUCHODOLSKI et al., 2005; SUCHODOLSKI et al., 2008; MIDDELBOSS et al., 2010; HANDL et al., 2011; SUCHODOLSKI, 2011; SWANSON et al., 2011; HONNEFFER et al., 2017). Genaue Zahlen zur Zusammensetzung unterscheiden sich je nach Studie aufgrund von Unterschieden hinsichtlich der Methodik zur Untersuchung des Mikrobioms, wie zum Beispiel (z. B.) verschiedenen Desoxyribonukleinsäure-(DNA)-Extraktionsmethoden, weshalb ein direkter Vergleich zwischen Studien schwierig ist (SUCHODOLSKI, 2011; CLOONEY et al., 2016). Metagenomische Sequenzierung sowie Sequenzierung des 16S-ribosomalen-Ribonukleinsäure-(16S-rRNA)-Gens in Kotproben gesunder Hunde zeigten, dass Firmicutes und Bacteroidetes den Großteil der Phyla einnehmen (SWANSON et al., 2011; HONNEFFER et al., 2017), womit die intestinale Mikrobiota des Hundes große Ähnlichkeiten zu der des Menschen aufweist (ECKBURG et al., 2005; SWANSON et al., 2011; COELHO et al., 2018). Je nach Methodik machen Firmicutes und Bacteroidetes unterschiedlich große Anteile des caninen fäkalen Mikrobioms aus. Mittels metagenomischer Analyse nehmen diese jeweils etwa 35 % der gemessenen Sequenzen im Kot ein (SWANSON et al., 2011). Bei einer Sequenzierung des 16S-rRNA-Gens machten Bacteroidetes 27 bis 34 % und Firmicutes 17 bis 27 % der fäkalen bakteriellen Phyla aus (SWANSON et al., 2011). In einer anderen Studie waren mittels 16S-rRNA-Sequenzierung $95,36 \pm 5,19$ % Firmicutes und $2,25 \pm 5,37$ % Bacteroidetes im Kot anteilmäßig zu finden (HANDL et al., 2011). In einer weiteren Studie machten mittels 16S-rRNA-Sequenzierung Bacteroidetes 31 bis 34 % und Firmicutes 14 bis 28 % der fäkalen Sequenzen aus (MIDDELBOSS et al., 2010). Anteile der Proteobacteria wurden je nach Methodik mit 5 bis 15 % und Anteile der Fusobacteria mit 0,3 bis 44 % im Kot beschrieben (MIDDELBOSS et al., 2010; HANDL et al., 2011; SWANSON et al., 2011).

Die Zusammensetzung und Vielfalt des Mikrobioms variiert zwischen verschiedenen Teilen des Gastrointestinaltraktes, wobei die bakterielle Vielfalt

entlang des Gastrointestinaltraktes steigt (SUCHODOLSKI et al., 2005). Im Magen machen *Helicobacter* Spezies (spp.), die der Mukosa anheften, den Großteil der Bakterien aus (GARCIA-MAZCORRO et al., 2012). Zusätzlich dominieren *Lactobacillus* spp., sowie *Streptococcus* spp. und *Clostridium* spp. (SUCHODOLSKI, 2011). Der Dünndarm gesunder Hunde wird sowohl von Aerobiern, sowie fakultativen Anaerobiern besiedelt, während sich im Dickdarm hauptsächlich strikte Anaerobier befinden (BENNO et al., 1992; MENTULA et al., 2005; SUCHODOLSKI, 2011). Während im Dünndarm Proteobacteria bis zu ein Drittel der bakteriellen Phyla ausmachen, nehmen sie im Dickdarm nur circa 1 % der Gesamtpopulation ein (SUCHODOLSKI et al., 2008; XENOULIS et al., 2008; HONNEFFER et al., 2017). Die häufigste mittels Sequenzierung des 16S-rRNA-Gens ermittelte Ordnung stellen im Duodenum und Jejunum Clostridiales und im Ileum und Colon Fusobacteriales und Bacteroidales dar (SUCHODOLSKI et al., 2008). Enterobacteriales werden im Dünndarm in höheren Mengen nachgewiesen als im Dickdarm (SUCHODOLSKI et al., 2008). Die Ordnung Lactobacillales kann sowohl in Duodenum, Jejunum, als auch Colon in großen Mengen gefunden werden, wohingegen diese nur circa 1 % im Ileum ausmachen (SUCHODOLSKI et al., 2008). Im Kot stellen Clostridiales, Erysipelotrichales, Lactobacillales und Coriobacteriales die dominanten Ordnungen dar (GARCIA-MAZCORRO et al., 2011). Mittels 16S-rRNA-Sequenzierung konnten weiterhin Unterschiede hinsichtlich bakterieller Familien zwischen verschiedenen Teilen des Gastrointestinaltraktes festgestellt werden (HONNEFFER et al., 2017). So steigt z. B. die Anzahl der Bacteroidaceae und Ruminococcaceae vom Duodenum zum Rektum an (HONNEFFER et al., 2017). Bezüglich bakterieller Genera lassen sich im Kot gesunder Hunde im Durchschnitt 12 % *Ruminococcus* spp., 5 % *Blautia* spp., 4 % *Lactobacillus* spp., 3 % *Bifidobacterium* spp., 1 % *Bacteroides* spp. und *Prevotella* spp., sowie unter 1 % *Fusobacterium* spp. nachweisen (GARCIA-MAZCORRO und MINAMOTO, 2013).

Jeder Hund weist außerdem ein individuelles intestinales mikrobielles Profil auf, das sich vor allem in unterschiedlicher Zusammensetzung bakterieller Spezies und Stämme in Proben aus Kolon und Rektum zeigt (SIMPSON et al., 2002; SUCHODOLSKI et al., 2004, 2005). Trotz der phylogenetischen Unterschiede, besitzen Individuen einen vergleichbaren Pool mikrobieller Gene, weshalb sich metabolische Endprodukte in der Regel zwischen gesunden Individuen ähneln

(LEY et al., 2008; TURNBAUGH et al., 2009; SUCHODOLSKI, 2011; GUARD und SUCHODOLSKI, 2016).

1.2. Aufgaben im Wirtsorganismus

Das intestinale Mikrobiom stellt ein hochkomplexes Ökosystem dar und fungiert als metabolisches Organ, das multiple Aufgaben im Wirtsorganismus erfüllt (BACKHED et al., 2005). Wichtige Funktionen, an denen das intestinale Mikrobiom teilhat, sind unter anderem eine physiologische Entwicklung des Gastrointestinaltraktes, die Modulation des Immunsystems, der Schutz des Wirtes vor Pathogenen, die Unterstützung der Darmbarriere und die Bereitstellung von Nährstoffen (BAUER et al., 2006; KAMADA et al., 2013; ROWLAND et al., 2018; TIZARD und JONES, 2018). Ein gesundes Mikrobiom ist daher unerlässlich für die Gesundheit des Wirtes. Bereits während früher Lebensphasen des Wirtes spielt es eine entscheidende Rolle in der physiologischen Entwicklung des Gastrointestinaltraktes sowie in einer adäquaten Entwicklung des Immunsystems (BAUER et al., 2006). So konnte bei gnotobiotischen Mäusen gezeigt werden, dass diese eine veränderte Architektur der Darmwand aufweisen, was sich z. B. in verminderter Entwicklung des darmassoziierten lymphatischen Gewebes (GALT), der Peyer'schen Platten und der mesenterialen Lymphknoten im Vergleich zu normalen Mäusen äußerte (MACPHERSON und HARRIS, 2004).

Stoffwechselwege, an denen die intestinale Mikrobiota teilhat, konnten mittels metagenomischer Analyse untersucht werden und in funktionale metabolische Kategorien eingeteilt werden. Hier zeigte sich, dass die meisten bakteriellen Gensequenzen dem Kohlenhydrat-Metabolismus, dem DNA- und RNA-Metabolismus, dem Protein-Metabolismus, der Vitamin- und Cofaktor-Biosynthese, dem Zellwandaufbau sowie Virulenzfaktoren zugeordnet werden können (SWANSON et al., 2011). Die Bildung von kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) und sekundären Gallensäuren (GS) sind weitere wichtige metabolische Stoffwechselprozesse, an denen intestinale Bakterien teilhaben (ROWLAND et al., 2018). Einige intestinale Bakterien, wie z. B. *Ruminococcus* spp., *Faecalibacterium* spp., *Dorea* spp. und *Turicibacter* spp. sind in der Lage Kohlenhydrate aus der Nahrung zu fermentieren und daraus SCFA, hauptsächlich Acetat, Butyrat und Propionat, zu bilden, die dann dem Wirt zur Verfügung stehen (SUCHODOLSKI, 2011). Diese haben wiederum vielfältige Funktionen, indem sie unter anderem als Energiequelle für Enterozyten dienen, die Motilität des Darms

beeinflussen, anti-entzündlich wirken und durch pondus-Hydrogenii-(pH)-Wert-Senkung die Vermehrung pH-sensitiver Pathogene hemmen (CHERRINGTON et al., 1991; ARPAIA et al., 2013; SMITH et al., 2013; KIM et al., 2014). Intestinale Bakterien spielen auch im GS-Metabolismus eine Rolle, indem bakterielle Spezies des Phylums Firmicutes, bei Hunden vor allem die Spezies *C. hiranonis*, im Kolon primäre GS, die im Ileum nicht rückresorbiert wurden, in sekundäre GS umwandeln (KITAHARA et al., 2001; GUARD, 2017). Sekundäre GS sind Signalmoleküle und somit unter anderem in der Lage an Rezeptoren, wie z. B. den GS-spezifischen G-Protein-gekoppelten GS-Rezeptor (TGR5), zu binden, wodurch die Bildung proinflammatorischer Zytokine gemindert wird (KAWAMATA et al., 2003). Zudem haben sie über den Farnesoid-X-Rezeptor Einfluss auf den Glucose-Metabolismus (TRAUNER et al., 2010).

Weitere Metaboliten, die von der intestinalen Mikrobiota gebildet werden und dem Wirt somit zur Verfügung stehen, sind z. B. B-Vitamine sowie Vitamin K (LEBLANC et al., 2011).

Zwischen der intestinalen Mikrobiota und den Zellen des Wirtes findet eine ständige Interaktion statt. Diese kann entweder über direkten Kontakt zwischen mikrobiellen Zellen und Rezeptoren auf Wirtszellen oder indirekt, über von Mikroorganismen gebildete Metaboliten, stattfinden, wodurch Kommensalen des Gastrointestinaltraktes einen Einfluss auf das Immunsystem des Wirtes haben (HOOPER et al., 2012; KAINULAINEN et al., 2015). So führt z. B. von Bakterien physiologischerweise gebildetes Indol zu einer reduzierten Bildung proinflammatorischer Chemokine und einer gesteigerten Bildung antiinflammatorischer Zytokine (BANSAL et al., 2010). Bei gnotobiotischen Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese im Vergleich zu spezifisch pathogenfreien Mäusen signifikant weniger Immunglobulin-A-(IgA)-produzierende Plasmazellen in der Darmwand sowie signifikant weniger intraepitheliale Lymphozyten aufweisen, was in reduzierter immunologischer Abwehr resultiert (MACPHERSON und HARRIS, 2004).

Ein gesundes intestinales Mikrobiom trägt zudem zu einer intakten Darmbarriere bei, die essentiell ist, um eine Translokation z. B. von pathogenen Keimen zu vermeiden. Im Darm finden sich zwischen den Epithelzellen sogenannte Tight-Junctions, die aus spezifischen Proteinen gebildet werden und eine wichtige Barrierefunktion darstellen sowie den parazellulären Transport beeinflussen

(GASBARRINI und MONTALTO, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass von Bakterien gebildetes Indol die Bildung von Tight-Junction-Proteinen positiv beeinflusst (BANSAL et al., 2010).

Ein Schutz vor Pathogenen kann nicht nur über den Einfluss auf das Immunsystem, eine intakte Darmbarriere oder die Bildung von SCFA oder GS gewährleistet werden. Intestinale Bakterien sind zudem in der Lage direkt vor Pathogenen zu schützen, indem sie z. B. sogenannte Bakteriozine, antimikrobielle Peptide, bilden, die spezifisch Bakterien der gleichen oder einer ähnlichen Art abtöten können (HAMMAMI et al., 2013). Weiterhin können Kommensalen Pathogene hemmen, indem sie mit ihnen um Nährstoffe konkurrieren (MOMOSE et al., 2008).

1.3. Labordiagnostische Untersuchung

Zum Nachweis von Bakterien im Gastrointestinaltrakt gibt es verschiedene Verfahren. Der Fokus liegt bei modernen Untersuchungsmethoden nicht nur auf dem Nachweis potentiell pathogener Keime, sondern auf der Erfassung der vielfältigen intestinalen Mikrobiota sowie deren Funktion (COSTA und WEESE, 2019). Mittels moderner Hochdurchsatzverfahren der DNA-Sequenzierung und bioinformatischen Analysen konnte die Untersuchung des intestinalen Mikrobioms in den letzten Jahren revolutioniert werden (TURNBAUGH et al., 2007; BARKO et al., 2018).

1.3.1. Bakterielle Kultivierung

Bei der bakteriellen Kultivierung werden Mikroorganismen in beziehungsweise (bzw.) auf speziellen Nährmedien unter bestimmten Bedingungen vermehrt und können dann anhand verschiedener Merkmale, wie z. B. ihrer Morphologie, identifiziert und anschließend quantifiziert werden (MARKEY et al., 2013). Die Kultivierung ist eine günstige aber zeitaufwändig Methode, die über viele Jahre die einzige Möglichkeit zur Erfassung von intestinalen Bakterien darstellte (COSTA und WEESE, 2019). Mittels herkömmlicher Kultivierungs-Methoden kann nur ein Bruchteil intestinaler Bakterien nachgewiesen werden (AMANN et al., 1995; HAYASHI et al., 2002; LESER et al., 2002; SUCHODOLSKI, 2016). Gründe dafür sind unter anderem, dass Spezies mit einer bestimmten Kultivierungsmethode nicht kultivierbar sind, oder sich zwar mit der gewählten Kultivierungsmethode anzüchten lassen würden, aber sich in einem nicht-kultivierbaren Zustand befinden, wie es z. B. bei *Salmonella enteritidis* beschrieben wurde (ROSZAK et al., 1984).

Weiterhin kann eine Kultivierung fehlschlagen, wenn sich unbekannte Spezies in einer Probe befinden, für die passende Kultivierungsmethoden nicht etabliert sind (AMANN et al., 1995). Somit lassen sich vor allem Bakterien kultivieren, die schnellwachsend sind, aerob leben und sich demnach leicht unter Laborbedingungen vermehren, während die intestinalen Bakterien größtenteils strikte Anaerobier sind und demnach schwierig anzuzüchten sind (HIERGEIST et al., 2015).

Eine herkömmliche bakterielle Kultivierung eignet sich daher nur bedingt, um einen Rückschluss auf die komplexe Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms zu ziehen (SUAU et al., 1999). In den letzten Jahren wurden sogenannte „Culturomics“-Analysen entwickelt, bei denen mittels vieler verschiedener Nährmedien und unterschiedlicher Bedingungen der Lebensraum der in einer Probe enthaltenen Bakterien nachgeahmt wird (LAGIER et al., 2012). Mittels dieses Verfahrens konnte der Großteil der intestinalen Bakterien kultiviert werden (LAU et al., 2016). Diese Verfahren sind jedoch nur in speziellen Forschungslabors etabliert.

1.3.2. Molekulare Methoden

Mit Hilfe molekularer Methoden wird bakterielle DNA oder Ribonukleinsäure (RNA) nachgewiesen, wodurch der Nachweis bisher unbekannter intestinaler Bakterien erfolgen konnte (SUAU et al., 1999). Je nach Methode werden diese derzeit nur zu wissenschaftlichen Zwecken eingesetzt und sind mit hohen Kosten verbunden.

In allen prokaryotischen Zellen, also Bakterien und Archaeen, kodiert das 16S-rRNA-Gen für ein ribosomales RNA-Molekül der 30S-Untereinheit des Ribosoms (FUKUDA et al., 2016). Dieses Gen enthält mehrere konservierte Regionen, die zwischen nahezu allen Bakterien identisch sind, weshalb bei vielen molekularen Methoden zur Identifikation von Bakterien das 16S-rRNA-Gen herangezogen wird (OLSEN et al., 1986). Zwischen den konservierten Regionen weist das Gen variable Regionen auf, die sich zwischen Bakterien unterscheiden und zur Klassifizierung verwendet werden können (OLSEN et al., 1986; FUKUDA et al., 2016).

1.3.2.1. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Bei einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) werden kurze Nukleinsäure-

Sequenzen innerhalb einer intakten bakteriellen Zelle ohne vorherige DNA- oder RNA-Extraktion nachgewiesen, indem spezifische fluoreszierende Oligonukleotid-Sonden an sie binden (MOTER und GOBEL, 2000). Mittels FISH können direkte Rückschlüsse auf Anwesenheit, Anzahl, Morphologie und Lokalisation von Mikroorganismen z. B. in einer Gewebeprobe unter dem Mikroskop gezogen werden (MOTER und GOBEL, 2000). In Bezug auf den Gastrointestinaltrakt lässt sich somit visualisieren, ob Mikroorganismen z. B. intraluminal, dem Darmepithel anhaftend oder innerhalb der Mukosa liegen. Diese Methode findet in der Tiermedizin z. B. regelmäßig Anwendung beim Nachweis enteroinvasiver *Escherichia (E.) coli* in der Dickdarmmukosa bei Hunden mit granulomatöser Kolitis (SIMPSON et al., 2006).

1.3.2.2. Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe einer Polymerasekettenreaktion (PCR) können spezifische Gruppen oder Spezies von Organismen nach DNA-Extraktion durch Vervielfältigung der DNA nachgewiesen werden (CHRISTEN et al., 2015). Hierfür sind spezifische Primer notwendig, um die bakteriellen Gruppen oder Spezies anhand der Regionen des 16S-rRNA-Gens nachzuweisen. Während einer PCR wird die DNA mittels Hitze denaturiert und zwei Oligonukleotide, die sich im Bereich des 16S-rRNA-Gens anlagern, sowie die vier Desoxyribonukleosidtriphosphate zugegeben. Das Enzym DNA-Polymerase lagert folglich die Desoxyribonukleosidtriphosphate an die DNA-Matrize an. Die dabei entstehenden doppelsträngigen PCR-Produkte werden erneut denaturiert und im Rahmen mehrerer Zyklen exponentiell amplifiziert (MULLIS und FALOONA, 1987). Bei einer quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) wird, im Gegensatz zur normalen PCR, bei der eine Quantifizierung erst nach Abschluss des PCR-Prozesses möglich ist, zeitgleich zur DNA-Amplifizierung eine Quantifizierung gewährleistet. Dies erfolgt, indem fluoreszierende Farbstoffe, wie z. B. Ethidiumbromid oder SYBR Green I, an die akkumulierenden doppelsträngigen DNA-Produkte binden und somit eine Steigerung des Fluoreszenzsignals gemessen werden kann. (HIGUCHI et al., 1993; MORRISON et al., 1998).

Dieses Verfahren eignet sich in Bezug auf das intestinale Mikrobiom weniger, um einen umfassenden Einblick zu erlangen, sondern vielmehr, um spezifische bakterielle Gruppen zu detektieren (COSTA und WEESE, 2019). Diese Methode erlaubt somit z. B. Verlaufskontrollen während einer Therapie durchzuführen, um

den Einfluss auf bestimmte bakterielle Gruppen zu evaluieren und Werte miteinander vergleichen zu können (GRONVOLD et al., 2010).

Ein 2017 entwickeltes qPCR-basiertes Verfahren, der sogenannte Dysbiose-Index (DI), stellt in der Tiermedizin eine neue Möglichkeit dar, um eine intestinale Dysbiose bei Hunden mittels Kotuntersuchung zu ermitteln (ALSHAWAQFEH et al., 2017b). Der DI wurde ursprünglich an Hunden mit chronischer Enteropathie validiert und zeigt eine Sensitivität von 74 % sowie eine Spezifität von 95 % zur Unterscheidung zwischen gesunden Hunden und Hunden mit chronischer Enteropathie. Er ist reproduzierbar, kostengünstiger und schneller durchführbar als gängige Sequenzierungs-Verfahren und eignet sich somit insbesondere für Verlaufskontrollen. Der DI bezieht bakterielle Taxa mit ein, die sich in vorherigen qPCR- oder 16S-rRNA-Gen-Sequenzierungs-basierten Studien bei Hunden mit gastrointestinalen Erkrankungen im Vergleich zu gesunden Hunden signifikant verändert zeigten. Hierbei wurden Studien miteinbezogen, die Veränderungen im Mikrobiom bei Hunden mit Inflammatory Bowel Disease (IBD), mit akutem blutigem und nicht-blutigem Durchfall sowie mit exokriner Pankreasinsuffizienz beschrieben (XENOULIS et al., 2008; SUCHODOLSKI et al., 2010; SUCHODOLSKI et al., 2012a; SUCHODOLSKI et al., 2012b; MINAMOTO et al., 2014b; MINAMOTO et al., 2014a; ROSSI et al., 2014; GUARD et al., 2015; VAZQUEZ-BAEZA et al., 2016; ALSHAWAQFEH et al., 2017a; ISALAH et al., 2017). Die Menge an Bakterien der sieben bakteriellen Taxa *Faecalibacterium* spp., *Turicibacter* spp., *Streptococcus* spp., *E. coli*, *Blautia* spp., *Fusobacterium* spp. und *C. hiranonis*, sowie die totale Bakterienmenge wird im Rahmen des DI ermittelt und mittels mathematischem Algorithmus zu einer einzelnen Zahl verrechnet. Ein $DI < 0$ spricht für eine Normobiose, während ein $DI > 0$ für eine Dysbiose spricht. Je höher der DI, desto stärker weicht das Mikrobiom in der entsprechenden Kotprobe von einer Normobiose ab (ALSHAWAQFEH et al., 2017b).

1.3.2.3. DNA-Sequenzierung

1.3.2.3.1. 16S-rRNA-Amplikon-Sequenzierung

Mittels 16S-rRNA-Amplikon-Sequenzierung werden spezifische Nukleotid-Abfolgen der variablen Regionen der 16S-rRNA ermittelt, wobei die PCR einen Teilschritt dieser DNA-Sequenzierungsmethode darstellt (ANSORGE, 2009). Die dabei selektiv amplifizierten DNA-Fragmente werden Amplikons genannt. Ältere

Verfahren zur Gensequenzierung, wie z. B. die Sanger-Sequenzierung, die eine kostenintensive Methode darstellt, um kleine Probenzahlen zu analysieren oder begrenzte Sequenzinformationen spezifischer Gen-Regionen zu gewinnen, wurden in der Vergangenheit durch Hochdurchsatzverfahren abgelöst (SANGER et al., 1977; MOROZOVA und MARRA, 2008).

Die heutzutage am häufigsten verwendete Methode zur Mikrobiom-Analyse ist die Illumina-Sequenzierung (COSTA und WEESE, 2019). Diese Methode zählt zu der sogenannten „Sequenzierung der nächsten Generation“, aus dem Englischen „next generation sequencing“, und ermöglicht die gleichzeitige Analyse vieler Proben ohne eine vorherige Klonierung. Sie stellt im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung eine deutlich günstigere und zeitsparendere Methode dar (FUKUDA et al., 2016). Bei dieser Methode befinden sich spezifische Adapter an den Enden der doppelsträngigen DNA-Fragmente. Nach Denaturierung in Einzelstränge kommt es zu einer Brückenamplifizierung auf einer Glasplatte, die sogenannte „flow cell“, bei der Cluster mit gleicher Sequenz aus den DNA-Fragmenten entstehen. Im Folgenden werden die entstandenen Cluster sequenziert, wobei sich fluoreszenzmarkierte Nukleotide anlagern und somit eine Identifikation ermöglicht wird. Hierbei können hunderte bis zu Millionen Cluster parallel sequenziert werden (BENTLEY et al., 2008). Anschließend werden die Ergebnisse mit Hilfe spezieller Software, wie z. B. QIIME oder mothur, ausgewertet, indem die ermittelten Sequenzen mit Datenbanken, wie z. B. Greengenes, SILVA oder RDP, abgeglichen werden (BALVOCIUTE und HUSON, 2017; LAWLEY und TANNOCK, 2017; SCHLOSS, 2020). Bei der Illumina-Sequenzierung kann es aufgrund der erzeugten kurzen DNA-Sequenzen zu verminderter Genauigkeit der taxonomischen Identifikation bakterieller Arten kommen (COSTA und WEESE, 2019).

1.3.2.3.2. Metagenomische Sequenzierung

Eine weitere heutzutage häufig verwendete Methode zur Analyse des Mikrobioms ist die Metagenom-Sequenzierung, auch „Shotgun sequencing“ genannt, mittels derer mikrobielle Gemeinschaften eines Habitats untersucht werden können (HILLMANN et al., 2018). Bei diesem Verfahren wird nicht das 16S-rRNA-Gen zu Analyse herangezogen. Stattdessen wird die gesamte in einer Probe enthaltene DNA zunächst extrahiert und dann in willkürlich große Fragmente geteilt, woraufhin alle vorhandenen Gene sequenziert werden (ANDERSON, 1981). Eine Software setzt daraufhin aus den kurzen Sequenzfragmenten die

Sequenzinformation aller Gene zusammen, die dann mit Referenzkatalogen abgeglichen werden (HILLMANN et al., 2018). Eine vorherige Klonierung oder Amplifizierung spezifischer Gene mittels PCR ist bei diesem Verfahren nicht notwendig (HUSON et al., 2009). Da bei der Metagenom-Sequenzierung, im Gegensatz zu den herkömmlichen Sequenzierungs-Verfahren, nicht nur das 16S-rRNA-Gen analysiert wird, bietet die metagenomische Analyse nicht nur Einsicht in die phylogenetische Zusammensetzung des Mikrobioms, sondern auch in die physiologischen Stoffwechselaktivitäten der enthaltenen Mikroorganismen (TRINGE und HUGENHOLTZ, 2008). So können anhand der Ergebnisse Rückschlüsse auf Stoffwechselvorgänge bestimmter bakterieller oder wirtsspezifischer Metaboliten gezogen werden (SUCHODOLSKI, 2016).

1.4. Abweichungen des intestinalen Mikrobioms

Abweichungen in der Zusammensetzung und/oder der Vielfalt der intestinalen Mikrobiota werden im Allgemeinen unter dem Begriff „Dysbiose“ (von „dys“, griechisch für „schlecht“) zusammengefasst (BANAY, 1948; SUCHODOLSKI, 2016).

Eine intestinale Dysbiose führt zu einer reduzierten bakteriellen Funktion (SUCHODOLSKI, 2016). Die Konsequenzen einer Dysbiose lassen sich folglich aus den Aufgaben der intestinalen Mikrobiota, die im Rahmen einer Dysbiose nicht adäquat erfüllt werden können, ableiten. Somit können sich die Folgen einer Dysbiose, in Abhängigkeit davon welche bakteriellen Gruppen in welchem Ausmaß verändert sind und welche bakteriellen Mechanismen daraus resultierend beeinflusst werden, vielfältig äußern. Allgemein kann es aufgrund einer intestinalen Dysbiose zu einer Beeinträchtigung des Immunsystems, zu einer Herabsetzung der Darmbarriere sowie zu verminderter Bildung wichtiger bakterieller Metaboliten, wie z. B. SCFA oder sekundärer GS, kommen, die daraufhin ihre multiplen Funktionen im Wirtsorganismus nicht mehr erfüllen können (MINAMOTO et al., 2014a; GUARD, 2017; LEVY et al., 2017; HIIPPALA et al., 2018). Da diese Metaboliten unter anderem immunmodulatorisch wirken, können als Folge einer Dysbiose pro-inflammatorische Vorgänge begünstigt werden, wodurch eine intestinale Entzündung entstehen kann (BRESTOFF und ARTIS, 2013). Weiterhin können das durch die Dysbiose beeinträchtigte Immunsystem sowie die herabgesetzte Darmbarriere zu reduzierter Abwehr gegenüber Pathogenen führen (BUFFIE und PAMER, 2013).

Systemische langfristige Folgen einer intestinalen Dysbiose sind weiterhin Gegenstand humanmedizinischer Studien. Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass eine Assoziation zwischen einer intestinalen Dysbiose und bestimmten Erkrankungen, wie z. B. Übergewicht, Diabetes mellitus Typ 2 und Asthma, besteht (KALLIOMAKI et al., 2008; ARRIETA und FINLAY, 2014; TILG und MOSCHEN, 2014).

Hunde sowohl mit akuten, als auch chronischen gastrointestinalen Erkrankungen weisen eine intestinale Dysbiose auf (XENOULIS et al., 2008; ALLENSPACH et al., 2010; SUCHODOLSKI et al., 2010; MARKEL, 2012; ROSSI, 2014; SUCHODOLSKI et al., 2012a; SUCHODOLSKI et al., 2012b; HONNEFFER et al., 2014; MINAMOTO et al., 2014b; MINAMOTO et al., 2014a; GUARD et al., 2015; VAZQUEZ-BAEZA et al., 2016; ALSHAWAQFEH et al., 2017b; HEILMANN et al., 2017; ISALIAH et al., 2017). Dass eine intestinale Dysbiose eine gastrointestinale Erkrankung auslösen kann, konnte z. B. in einem Mäuseversuch gezeigt werden. In diesem Versuch wurde die intestinale Mikrobiota genmodifizierter Mäuse, die aufgrund der Genmodifikation eine Kolitis entwickelten, in genetisch intakte Mäuse übertragen, die daraufhin ebenfalls eine Kolitis entwickelten (GARRETT et al., 2007). In einer humanmedizinischen Studie konnte dagegen gezeigt werden, dass z. B. Angehörige von an Morbus Crohn erkrankten Personen ebenfalls Abweichungen in der intestinalen Mikrobiota, verglichen mit gesunden Individuen, aufwiesen und dennoch keine klinischen Symptome entwickelten, wobei sich das Muster der Dysbiose von dem der an Morbus Crohn erkrankten unterschied (JOOSSENS et al., 2011). Ob eine Dysbiose im Rahmen einer gastrointestinalen Erkrankung als Ursache der Erkrankung anzusehen ist, oder, ob sie sekundär dazu auftritt, kann in der Regel nicht geklärt werden (BUTTO und HALLER, 2016).

1.4.1. Akute Enteropathien

SUCHODOLSKI und Mitarbeiter (2012b) evaluierten mittels Sequenzierung des 16S-rRNA-Gens sowie mittels qPCR das fäkale Mikrobiom von Hunden mit akutem hämorrhagischem Durchfall ($n = 13$) und verglichen dies mit dem Mikrobiom von Hunden mit akutem nicht-hämorrhagischem Durchfall ($n = 12$), mit aktiver ($n = 9$), sowie therapeutisch eingestellter IBD ($n = 10$) und gesunden Hunden ($n = 32$). Zudem wurden mittels qPCR die gesamte Bakterienzahl sowie die spezifischen Bakteriengruppen Bacteroidetes, Fusobacteria, *Blautia* spp.,

Ruminococcaceae, *Faecalibacterium* spp., *Turicibacter* spp., *Bifidobacterium* spp. und *C. perfringens* ermittelt. Dabei wiesen Hunde mit gastrointestinaler Erkrankung, verglichen mit gesunden Hunden, Abweichungen im Mikrobiom auf. Insbesondere bei Hunden mit akutem hämorrhagischem Durchfall zeigte sich in der Sequenzierung ein hochgradig verändertes Mikrobiom, das signifikante Unterschiede zu gesunden, aber auch zu Hunden mit akutem nicht-hämorrhagischem und chronischem Durchfall aufwies. Diese Veränderungen äußerten sich in einer signifikanten Erhöhung der Gattung *Sutterella* sowie von *C.-perfringens*-ähnlichen-Sequenzen. Das Phylum Fusobacteria war zudem erhöht, erreichte jedoch in der statistischen Auswertung keine Signifikanz. Weiterhin zeigten Hunde mit akutem hämorrhagischem und akutem nicht-hämorrhagischem Durchfall signifikant niedrigere Mengen von Actinobacteria und mehreren Vertretern der Firmicutes, vor allem der Ruminococcaceae, *Blautia* spp. und *Turicibacter* spp.. In der qPCR zeigten sich signifikant niedrigere Mengen an Ruminococcaceae, *Blautia* spp. und *Turicibacter* spp. und zudem *Faecalibacterium* spp., während bei Hunden mit akutem hämorrhagischem Durchfall zeitgleich eine höhere Menge an *C. perfringens* auftrat, verglichen mit gesunden Hunden. In einer Studie von MARKEL und Mitarbeitern (2012) wurde das Mikrobiom von Hunden mit akutem hämorrhagischem Durchfall (n = 57) mit dem von Hunden mit chronischer Enteropathie (n = 118) und gesunden Hunden (n = 242) verglichen. Hierbei wurde mittels qPCR die Menge an *Faecalibacterium* spp., *Turicibacter* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., Ruminococcaceae, *C. perfringens*, *E. coli*, γ -Proteobacteria, Bacteroidetes und Firmicutes im Kot untersucht. Es zeigte sich, dass Hunde mit akutem hämorrhagischem Durchfall, sowie mit chronischer Enteropathie signifikant niedrigere Mengen an *Faecalibacterium* spp., *Turicibacter* spp. sowie Ruminococcaceae, verglichen mit gesunden Hunden, aufwiesen. Weiterhin hatten Hunde mit akutem hämorrhagischem Durchfall signifikant niedrigere Mengen an *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp. und Firmicutes. *E. coli* waren bei Hunden mit akutem hämorrhagischem Durchfall, sowie mit chronischer Enteropathie signifikant erhöht im Vergleich zu gesunden Hunden. GUARD und Mitarbeiter (2015) untersuchten mittels 16S-rRNA-Sequenzierung sowie mittels qPCR das Mikrobiom von Hunden mit akutem hämorrhagischem Durchfall in Kotproben und verglichen es mit dem von Hunden mit akutem nicht-hämorrhagischem Durchfall und von gesunden Hunden. Hier zeigte sich, dass sich das Mikrobiom der Hunde

mit akutem hämorrhagischem und nicht-hämorrhagischem Durchfall signifikant von dem der gesunden Hunde unterschied, ohne signifikanten Unterschied zwischen den beiden Durchfall-Arten. Das Phylum Bacteroidetes, die Familie Ruminococcaceae sowie das Genus *Faecalibacterium* waren im Vergleich zu gesunden Hunden bei Hunden mit akutem Durchfall in signifikant niedrigeren fäkalen Mengen messbar. Zudem waren *Clostridium* spp. signifikant mit Durchfall assoziiert. *Prevotella* spp., *Blautia* spp., *Faecalibacterium* spp., *Eubacterium* spp. und unklassifizierte Gattungen der Familien Ruminococcaceae, Lachnospiraceae, Clostridia, Ruminococcaceae und Coprobacillaceae dagegen waren in signifikant höheren Mengen bei gesunden Hunden zu finden. In der qPCR konnte kein Unterschied zwischen gesunden Hunden und Hunden mit akutem Durchfall hinsichtlich *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* und *E. coli* gefunden werden. HEILMANN und Mitarbeiter (2017) zeigten mittels qPCR, dass an AHDS erkrankte Hunde zu Beginn der Erkrankung niedrige Mengen an Ruminococcaceae, *Faecalibacterium* spp. und *Bifidobacterium* spp. aufweisen. Weiterhin beobachteten sie den Verlauf dieser Bakterien sowie der Proteobacteria über einen Zeitraum von drei Tagen, wobei nur die Menge an Ruminococcaceae signifikant sank, während es zu keinen Veränderungen der Mengen an *Faecalibacterium* spp., *Bifidobacterium* spp. und Proteobacteria kam.

1.4.1.1. Die Rolle von *Clostridium perfringens* und Enterotoxin-bildenden *Clostridium perfringens* bei Akutem hämorrhagischem Diarrhoesyndrom

C. perfringens ist ein strikt anaerobes, grampositives, stäbchenförmiges, endosporenbildendes Bakterium. Es wird anhand seiner Fähigkeit, die Majortoxine alpha, beta, iota und epsilon zu bilden, in die fünf Serotypen (A – E) unterteilt (BROOKS et al., 1957). Jeder Serotyp kann weiterhin das Gen kodierend für Enterotoxin (CPE) tragen, weshalb die Fähigkeit zur CPE-Produktion nicht zur Einteilung herangezogen wird. Vor allem *C. perfringens* Typ A kann im Gegensatz zu den anderen Serotypen konsistent in der Umwelt sowie im Gastrointestinaltrakt von domestizierten Tieren nachgewiesen werden (SONGER, 1996). Weiterhin spielt *C. perfringens* Typ A eine Rolle bei Lebensmittelvergiftungen bei Menschen (LINDSTROM et al., 2011). Je nach Nachweismethode kann bei bis zu 100 % gesunder Hunde und Hunden mit gastrointestinaler Erkrankung *C. perfringens* detektiert werden, da *C. perfringens* ein Kommensale des Gastrointestinaltraktes ist

(WEESE et al., 2001; MARKS et al., 2002; MINAMOTO et al., 2014b).

Es bestehen Hinweise darauf, dass eine Überwucherung von *C. perfringens*, insbesondere toxinbildenden *C.-perfringens*-Stämmen, eine Rolle in der Pathogenese des AHDS spielen. UNTERER und Mitarbeiter (2014) konnten in histopathologischen Untersuchungen von Biopsien des Magens, Duodenums, Ileums und Kolons, die im Rahmen einer Endoskopie von an AHDS erkrankten Hunden gewonnen wurden, zeigen, dass der nekrotischen Darmschleimhaut stäbchenförmige Bakterien anhaften, die sich in der immunhistochemischen Untersuchung als *Clostridium* spp. herausstellten. Bei Kontrollhunden, die aufgrund anderer Ursachen als AHDS endoskopiert wurden, konnten dagegen keine der Schleimhaut anhaftenden Bakterien nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte sich bei Hunden mit AHDS, dass die Nekrose sich rein auf Dün- und Dickdarm beschränkte und in Biopsien des Magens keine Hinweise auf eine Entzündung oder Zerstörung der Schleimhaut bestanden. Während *C. perfringens* bei keinem von elf Kontrollhunden in der bakteriellen Kultur der Dünndarmbiopsien nachgewiesen werden konnte, konnten bei sechs von neun Hunden mit AHDS *C. perfringens* kultiviert werden. Auch mittels qPCR konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass Hunde mit akutem hämorrhagischem Durchfall verglichen mit gesunden Hunden eine signifikant höhere Menge an *C. perfringens* im Kot aufwiesen, was jedoch bei Hunden mit chronischer Enteropathie und Hunden mit akutem nicht-hämorrhagischem Durchfall nicht beobachtet werden konnte (MARKEL, 2012; SUCHODOLSKI et al., 2012b; MINAMOTO et al., 2014b; GUARD et al., 2015). Von CAVE und Mitarbeitern (2002) konnte eine signifikante Assoziation zwischen dem Auftreten von AHDS und einem Nachweis von CPE mittels Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) im Kot gefunden werden, die sich jedoch in einem anderen Nachweisverfahren, der Reverse-passive-latex-agglutination (RPLA), nicht zeigte. BUSCH und Mitarbeiter (2015) untersuchten Kotproben von 54 an AHDS erkrankten Hunden mittels qPCR auf das Vorhandensein von *C.-perfringens*-Enterotoxin-Genen (*cpe*) und mittels ELISA auf das Vorhandensein von CPE. Verglichen mit gesunden Hunden (n = 23) war die Prävalenz der Hunde, bei denen *cpe* bzw. CPE nachgewiesen werden konnte, bei Hunden mit AHDS signifikant höher. Während bei Hunden mit AHDS bei 35/54 (65 %) *cpe* und bei 13/54 (24 %) CPE nachgewiesen werden konnte, waren 9/23 (39 %) gesunden Hunden positiv für *cpe* und kein Hund (0 %) positiv für CPE.

Hinsichtlich der Laborparameter (Differentialblutbild, Serumchemieprofil, Serumgallensäurenkonzentration, Blutgerinnungszeiten) und dem Krankheitsaktivitätsindex konnte kein Unterschied zwischen *cpe*-positiven und *cpe*-negativen sowie CPE-positiven und CPE-negativen Hunden festgestellt werden. Beim Vergleich der Prävalenz von *C. perfringens*, *cpe* und CPE zwischen Hunden sowohl mit akutem, als auch mit chronischem Durchfall und gesunden Hunden konnten MINAMOTO und Mitarbeiter (2014b) feststellen, dass *C. perfringens* bei allen Hunden detektierbar war, jedoch in signifikant höherer Menge bei Patienten mit Durchfall, ohne signifikanten Unterschied zwischen akutem oder chronischem Verlauf. Während die Prävalenz des *cpe* bei Hunden mit akutem und chronischem Durchfall (50/104; 48,1 %) signifikant höher war verglichen mit gesunden Hunden (32/95; 33,7 %), konnte eine signifikant höhere Menge *cpe* bei akutem im Vergleich zu chronischem Durchfall festgestellt werden. Auch die Prävalenz des CPE war signifikant höher bei Hunden mit beiden Durchfallformen (17/104; 16,3 %) verglichen mit gesunden Hunden (1/95; 1,0 %).

1.4.1.2. Die Rolle von NetF-Toxin-bildenden *Clostridium perfringens* bei Akutem hämorrhagischem Diarrhoesyndrom

Das NetF-Toxin-Gen (*netF*) konnte 2015 von MEHDIZADEH GOHARI und Mitarbeitern (2015) auf einem *C.-perfringens*-Typ-A-Stamm (JFP718) identifiziert werden, der aus dem Kot eines zweijährigen Hundes isoliert wurde, welcher an den Folgen von akutem blutigem Durchfall verstorben war. Zusammen mit *netF* konnten weiterhin die Toxingene *netE* und *netG* auf dem JFP718-Isolat gefunden werden, wobei *netE* sich auf demselben konjugativen Plasmid wie *netF* befand, während *netG* auf demselben konjugativen Plasmid wie *cpe* lag. Sequenzanalysen zeigten, dass die *net*-Toxin-Gene für Proteine kodieren, die zur beta-porenbildenden Toxin-Familie gehören, zu der z. B. auch das Alpha-Toxin von *Staphylococcus aureus* zählt (ALONZO und TORRES, 2014). In *In-vitro*-Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass nur das *netF*, im Gegensatz zu *netE* und *netG*, hohes zytotoxisches Potential gegenüber einer equinen Ovarial-Zelllinie besaß. Das NetF-Toxin bindet als poren-bildendes Toxin an spezifische Rezeptoren auf Zellmembranen, wodurch transmembrane Poren entstehen, was folglich zu Zelllyse und somit Zellzerstörung führt (MEHDIZADEH GOHARI, 2018). In der Geflügelmedizin ist ein ähnliches Toxin, das NetB-Toxin, bereits länger bekannt und stellt einen essentiellen Faktor in der Pathogenese der

Nekrotisierenden Enteritis dar (KEYBURN et al., 2008).

Es besteht eine signifikante Assoziation zwischen der Nachweisbarkeit von *netF* im Kot und dem Auftreten von AHDS. In der oben genannten Studie von MEHDIZADEH GOHARI und Mitarbeitern (2015) wurden die Prävalenzen des Vorhandenseins von *netF* in *C.-perfringens*-Typ-A-Isolaten von Hunden mit akuter hämorrhagischer Diarrhoe (n = 11) und akuter unkomplizierter Diarrhoe (n = 81) verglichen. Bei 73 % (8/11) der Isolate aus akuter hämorrhagischer Diarrhoe konnte *netF* nachgewiesen werden, während bei 10 % (8/81) der Isolate aus akuter unkomplizierter Diarrhoe *netF* gefunden werden konnte. Eine weitere Studie zur Prävalenz von *netF* in *C.-perfringens*-Isolaten aus dem Duodenum bei Hunden mit AHDS, zeigte, dass in 5/5 (100 %) Isolaten *netF* nachgewiesen werden konnte, während 0/2 (0 %) Isolate von gesunden Hunden positiv waren (LEIPIG-RUDOLPH et al., 2018). Weitere Studien zur Prävalenz von *netF* beschränkten sich auf das Vorhandensein des Gens im Kot. In einer kombinierten qPCR für *netE* und *netF* konnten SINDERN und Mitarbeiter (2019) eine signifikant höhere Prävalenz der beiden Toxin-Gene im Kot von Hunden mit AHDS (26/54; 48 %) verglichen mit gesunden Hunden (8/66; 12 %) und Hunden mit Parvovirose (0/54, 0 %) feststellen. Auch im Vergleich zu Hunden mit exokriner Pankreasinsuffizienz (1/16; 6 %), mit chronischer Enteropathie (0/95; 0 %), mit akuter nicht-blutiger Diarrhoe (0/41; 0 %) und im Vergleich zu gesunden Hunden (0/130; 0 %) zeigte sich bei Hunden mit AHDS eine signifikant höhere Prävalenz von *netF* im Kot (19/45; 45 %) (SARWAR et al., 2018).

1.4.2. Chronische Enteropathien

Auch Hunde mit chronischer Enteropathie weisen eine intestinale Dysbiose auf (XENOULIS et al., 2008; ALLENSPACH et al., 2010; SUCHODOLSKI et al., 2010; ROSSI, 2014; SUCHODOLSKI et al., 2012a; HONNEFFER et al., 2014; MINAMOTO et al., 2014b; MINAMOTO et al., 2014a; VAZQUEZ-BAEZA et al., 2016; ISAIAH et al., 2017). Chronische Enteropathien sind charakterisiert durch gastrointestinale Symptome, die länger als drei Wochen andauern, und sie werden bei Hunden in der Literatur derzeit in Abhängigkeit des Ansprechens auf verschiedene therapeutische Ansätze in futtermittel-responsiv, antibiotika-responsiv und steroid-responsiv eingeteilt (SIMPSON und JERGENS, 2011; ERDMANN und HEILMANN, 2017). Die meisten Studien zum intestinalen Mikrobiom bei chronischen Enteropathien konzentrieren sich hierbei auf die

intestinale Dysbiose bei Hunden mit IBD. Die IBD ist charakterisiert durch persistierende oder wiederkehrende gastrointestinale Symptome, wie Durchfall, Gewichtsverlust oder Erbrechen und durch den histologischen Nachweis einer Entzündung des Gastrointestinaltraktes (ETTINGER et al., 2016). Die genaue Pathogenese der IBD ist nicht bekannt. Eine genetische Prädisposition, eine intestinale Dysbiose sowie diätetische und umweltbedingte Einflüsse werden als beitragende Faktoren diskutiert (WASHABAU et al., 2010; SIMPSON und JERGENS, 2011). Die Diagnosestellung findet unter Ausschluss aller möglicher Ursachen für chronische gastrointestinale Symptome sowie durch Feststellung einer Entzündung in Biopsien des Gastrointestinaltraktes mittels Histopathologie statt. Die Therapie der IBD hängt vom Schweregrad der klinischen Symptomatik ab und besteht in der Regel aus einer Anpassung der Diät, antibiotischer Therapie sowie Glukokortikoiden (SIMPSON und JERGENS, 2011).

Bei Hunden mit IBD liegt eine signifikant niedrigere bakterielle Vielfalt im Vergleich zu gesunden Hunden vor (XENOULIS et al., 2008; VAZQUEZ-BAEZA et al., 2016). Mittels 16S-rRNA-Sequenzierung konnten die Gattungen des Phylums Proteobacteria, wie *Diaphorobacter* und *Acinetobacter*, als mukosaanhaftende Bakterien in Biopsien des Duodenums in höherer Zahl als bei gesunden Hunden nachgewiesen werden (SUCHODOLSKI et al., 2012a). Weiterhin zeigten sich Fusobacteria, Bacteroidaceae, Prevotellaceae und Clostridiales bei Hunden mit IBD in verminderter Menge verglichen mit gesunden Hunden (SUCHODOLSKI et al., 2012a; SUCHODOLSKI et al., 2012b). Auch XENOULIS und Mitarbeiter (2008) untersuchten die der Duodenalmukosa anhaftende Mikrobiota und konnten bei Hunden mit IBD signifikant mehr Sequenzen der Familie Enterobacteriaceae, insbesondere der *E. coli*, nachweisen. Im Kot zeigte sich bei Hunden mit chronischer Enteropathie mittels 16S-rRNA-Sequenzierung auch eine erhöhte Menge an Gammaproteobacteria, während Erysipelotrichia, Clostridia und Bacteroidia vermindert detektiert werden konnten (MINAMOTO et al., 2014a). Mittels qPCR konnte im Kot von Hunden mit chronischer Enteropathie eine reduzierte Menge an *Blautia* spp. sowie Bakterien der Familie Ruminococcaceae, insbesondere der *Faecalibacterium* spp. und *Turicibacter* spp., ähnlich zu Hunden mit akutem hämorrhagischem Durchfall, nachgewiesen werden (MARKEL, 2012; MINAMOTO et al., 2014a; ROSSI et al., 2014). Dagegen konnten im Kot von Hunden mit chronischer Enteropathie,

verglichen mit gesunden Hunden, signifikant höhere Mengen an *Lactobacillus* spp. und *Streptococcus* spp. gefunden werden (MARKEL, 2012). Auch Menschen mit IBD zeigen eine verminderte Zahl der bakteriellen Phyla Firmicutes, Bacteroidetes und weisen eine erhöhte Zahl an Proteobacteria sowie Actinobacteria auf. Somit ähnelt das Muster der Dysbiose bei Menschen mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen dem von Hunden mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (PACKEY und SARTOR, 2009; VAZQUEZ-BAEZA et al., 2016).

Wenige Studien beschäftigten sich zudem mit anderen chronischen gastrointestinalen Erkrankungen und Abweichungen im Mikrobiom bei Hunden. So weisen auch Hunde mit exokriner Pankreasinsuffizienz im Vergleich zu gesunden Hunden Abweichungen im intestinalen Mikrobiom auf, die mittels 16S-rRNA-Sequenzierung gezeigt werden konnten (ISAIAH et al., 2017). Diese äußern sich in signifikant niedrigerer bakterieller Vielfalt, einer erhöhten Menge der Familien Bifidobacteriaceae, Enterococcaceae und Lactobacillaceae und reduzierter Menge an Lachnospiraceae und Ruminococcaceae (ISAIAH et al., 2017). Bei Hunden mit histiozytärer ulzerativer Colitis, einer Erkrankung, die häufig bei Boxern und französischen Bulldoggen auftritt, konnte mit Hilfe von FISH gezeigt werden, dass diese Patienten *E. coli* aufweisen, die der Kolonmukosa anhaften sowie intramukosal liegen (SIMPSON et al., 2006).

2. Probiotika

2.1. Definitionen

Der Begriff „Probiotika“ wurde in der Literatur erstmals von LILLY und STILLWELL (1965) erwähnt, die in einer Studie einen wachstumsfördernden Effekt auf Mikroorganismen durch von anderen Mikroorganismen gebildete Stoffe beobachteten und folglich gegenteilig zu wachstumshemmenden „Antibiotika“ den Begriff „Probiotika“ etablierten. Heutzutage werden Probiotika von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als lebende Mikroorganismen definiert, die einen gesundheitlichen Vorteil bringen, wenn sie in ausreichender Menge verabreicht werden (WHO/FAO, 2002). Davon abzugrenzen sind Präbiotika, die definiert sind als Substrate, die selektiv von Mikroorganismen des Wirtes genutzt werden können und dadurch einen gesundheitlichen Nutzen bringen. In der Regel bestehen Präbiotika aus Kohlenhydraten, zu ihnen zählen z. B.

Fructooligosaccharide, Galactooligosaccharide, Mannanooligosaccharide sowie einige diätetische Fasern (GIBSON et al., 2017). Als „Synbiotika“ bezeichnet man Präparate, die eine Kombination aus Probiotika und Präbiotika enthalten (SCHREZENMEIR und DE VRESE, 2001).

2.2. Charakteristika und Anforderungen

In probiotischen Präparaten enthaltene Mikroorganismen sind in der Regel solche, die traditionell mit gesundheitlichem Nutzen assoziiert wurden, wie z. B. Milchsäurebakterien (Ordnung Lactobacillales), zu denen *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. und *Streptococcus* spp. zählen. Des Weiteren werden auch *Bifidobacterium* spp., manche *Escherichia* spp. und Hefepilze, wie z. B. *Saccharomyces boulardii* als Probiotika eingesetzt (VERNA und LUCAK, 2010). Um eine positive Wirkung auf den Konsumenten zu haben, sollte ein probiotisches Produkt spezielle Eigenschaften, wie gute sensorische Eigenschaften und Stabilität während der Lagerung besitzen, die Passage durch den Gastrointestinaltrakt überstehen und für den Konsumenten sicher sein (SAARELA et al., 2000). Probiotika können einen oder mehrere bakterielle Stämme enthalten und werden somit in ein- und mehrstämmig unterteilt.

Gesetzlich gelten Probiotika als Futtermittelzusatzstoffe und werden somit in der Europäischen Union in der Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 geregelt. Ein probiotisches Produkt muss auf Wirksamkeit sowie Sicherheit getestet werden, wenn dieses als Futtermittelzusatzstoff für eine bestimmte Tierart registriert werden soll. Durchführungsbestimmungen zur Zulassung werden in der Verordnung (EG) Nr. 429/2008 geregelt. Im Rahmen dessen findet eine Entscheidung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit über die Erteilung oder Verweigerung der Zulassung des Zusatzstoffes statt. Derzeit sind zwei *E.-faecium*-Stämme, ein *Bacillus-subtilis*-Stamm sowie ein *L.-acidophilus*-Stamm als probiotische Bakterienstämme für Hunde zugelassen. Zugelassene Stämme können in dem Gemeinschaftsregister, das von der Europäischen Kommission gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 veröffentlicht wird, eingesehen werden.

2.3. Sicherheit

Die WHO hat in ihrem Bericht über Richtlinien zur Bewertung von Probiotika in Lebensmitteln Empfehlungen zu Anforderungen an die Sicherheit eines probiotischen Produktes dokumentiert. Folglich sollten Untersuchungen zu

Antibiotikaresistenz, metabolischer Aktivität, möglichen Nebenwirkungen, Toxinproduktion und hämolytischer Aktivität der enthaltenen Mikroorganismen erfolgen (WHO/FAO, 2002). In einem Übersichtsartikel von SOTOUDEGAN und Mitarbeitern (2019) wurden bisher dokumentierte Nebenwirkungen durch probiotische Behandlung in der Humanmedizin zusammengefasst. So gibt es mehrere Studien und Fallberichte, die eine Bakteriämie oder Fungämie mit einer probiotischen Therapie in Verbindung bringen konnten (APPEL-DA-SILVA et al., 2017; STROUPE et al., 2017). Weiterhin können gastrointestinale Nebenwirkungen, wie z. B. Durchfall oder Flatulenzen zu Beginn der Probiotika-Gabe auftreten, die in der Regel nach kurzer Zeit wieder abklingen (JOHNSTON et al., 2012). Bei Patienten mit akuter Pankreatitis konnte im Vergleich zu einer Placebo-Therapie eine höhere Mortalitätsrate bei probiotisch behandelten Patienten beobachtet werden. Die Beobachtung konnte jedoch in einer Metaanalyse nicht bestätigt werden (BESSELINK et al., 2008; GOU et al., 2014). Immunsupprimierte, schwer kranke oder an Krebs erkrankte Personen sowie Säuglinge scheinen einem besonders hohen Risiko ausgesetzt zu sein, Nebenwirkungen durch eine Probiotika-Behandlung zu entwickeln (SOTOUDEGAN et al., 2019).

In der Tiermedizin gibt es nach aktuellem Wissen derzeit keine Studien, die einen negativen Effekt einer Probiotika-Therapie bei Hunden beobachten konnten.

2.4. Wirkungsmechanismen

Probiotika haben eine stammspezifische Wirkung. Das bedeutet, dass jeder enthaltene Bakterien- oder Hefepilzstamm eine oder mehrere individuelle Funktionen erfüllt. Somit können sogar verschiedene Bakterienstämme derselben Bakterienart unterschiedliche Wirkungen haben (THOMAS und VERSALOVIC, 2010). Probiotische Bakterien können in der Regel circa zwei bis drei Tage nach Beginn der Behandlung und bis zu drei Tagen nach Absetzen des Probiotikums im Kot detektiert werden. Daraus wird geschlossen, dass die probiotische Wirkung nur während des Zeitraums der Verabreichung anhält und keine dauerhafte Kolonisation des Darms stattfindet (WEESE und ANDERSON, 2002; GARCIA-MAZCORRO et al., 2011). Dahingegen gibt es wenige Studien, die eine längere Nachweisbarkeit der verabreichten Bakterienstämme im Kot beschrieben, wie z. B. bis zu drei Monate für *E. faecium* EE3 oder fünf Monate für *L. fermentum* AD1 bei Hunden (MARCINAKOVA et al., 2006; STROMPFOVA et al., 2006).

Die genauen Wirkungsmechanismen von Probiotika wurden größtenteils in *in-vitro*-Studien oder in Tierversuchen mit Mäusen untersucht. Zu den wichtigsten Wirkungsweisen zählen die Unterdrückung von Pathogenen, Immunmodulation, Unterstützung der Darmbarriere, Bereitstellung von Nährstoffen sowie die Modulation des intestinalen Mikrobioms (OELSCHLAEGGER, 2010; BERMUDEZ-BRITO et al., 2012).

2.4.1. Einfluss auf Pathogene und Toxine

Eine Unterdrückung von Pathogenen durch Probiotika kann durch verschiedene Mechanismen erfolgen. Eine direkte Hemmung kann durch die Bildung antimikrobieller Stoffe erfolgen. Manche probiotische Bakterien, wie z. B. *Lactobacillus* spp. sind in der Lage antimikrobielle Peptide, sogenannte Bakteriozine, zu bilden, die Pathogene direkt abtöten können (MAQUEDA et al., 2008; MAJEED et al., 2011; DOBSON et al., 2012). Einige Stämme sind in der Lage organische Säuren, wie Milchsäure und Essigsäure, zu bilden, wodurch vor allem gram-negative Bakterien abgetötet werden (ALAKOMI et al., 2000; DE KEERSMAECKER et al., 2006). Auch durch indirekte Mechanismen können Pathogene durch Probiotika gehemmt werden. Eine indirekte Hemmung kann z. B. durch Konkurrenz um gleiche Nährstoffe, wie z. B. Eisen, erfolgen, die von probiotischen Bakterien verstoffwechselt werden und folglich nicht mehr für Pathogene zur Verfügung stehen (ELLI et al., 2000). Auch um Rezeptoren können Probiotika mit Pathogenen konkurrieren (NESSER et al., 2000; FUJIWARA et al., 2001). Weiterhin sind einige probiotische Stämme in der Lage ein Eindringen von Pathogenen in die intestinalen Epithelzellen oder die Adhäsion an intestinale Epithelzellen durch Förderung der Muzin-Produktion zu unterbinden (MACK et al., 2003; ALTENHOEFER et al., 2004). Auch die Bildung und Wirksamkeit bakterieller Toxine, wie z. B. *C.-difficile*-Toxin-A oder Shigatoxin, kann in Anwesenheit probiotischer Stämme gehemmt werden (ASAHARA et al., 2004; CHEN et al., 2006).

Bei Hunden konnten verschiedene Wirkungen auf Pathogene durch probiotische Therapie beobachtet werden. In einer Studie wurde die Adhäsion verschiedener Pathogene an caninen Jejunal Schleim, der aus permanenten Jejunumsonden gesunder Beagle entnommen wurde, *in vitro* untersucht. Hierbei zeigte sich, dass eine Zugabe von *Lactobacillus* spp. (*Lactobacillus* (L.) *rhamnosus* GG, *Bifidobacterium* (B.) *lactis* Bb12, *L. pentosus* UK1A, *L. pentosus* SK2A, *E. faecium*

M74 und *E. faecium* SF273) zu einer signifikant reduzierten Adhäsion von *C. perfringens* führte. Dahingegen konnte durch keinen der probiotischen Stämme ein Effekt auf die Adhäsion von *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium und *Staphylococcus intermedius* observiert werden, während eine gesteigerte Adhäsion von *Campylobacter jejuni* durch *E. faecium* M74 und *E. faecium* SF273 gezeigt werden konnte (RINKINEN et al., 2003). Eine *In-vivo*-Studie bei zwölf gesunden Hunden, die 18 Tage mit $9,2 \times 10^9$ KBE *E. faecium* NCIB 10415 einmal täglich behandelt wurden, zeigte, dass behandelte Hunde signifikant reduzierte Mengen an *Clostridium* spp. im Kot aufwiesen, während fäkale Mengen von *Salmonella* spp. und *Campylobacter* spp. nach der Applikation erhöht waren (VAHJEN und MANNER, 2003). Auch von BAILLON und Mitarbeitern (2004) konnte eine reduzierte Menge an *Clostridium* spp. im Kot bei 15 gesunden Hunden festgestellt werden, die über vier Wochen mit $> 10^9$ KBE *L. acidophilus* DSM13421 behandelt wurden.

2.4.2. Modulation des Immunsystems

Probiotische Bakterien sind, wie intestinale Kommensalen und Pathogene, in der Lage, direkt mit intestinalen Epithelzellen zu kommunizieren, und können somit direkt auf das Immunsystem des Wirtes Einfluss nehmen (BERMUDEZ-BRITO et al., 2012). So können z. B. *Lactobacillus* spp. die Bildung von Zytokinen durch T-Helfer-Zellen induzieren und natürliche Killerzellen aktivieren (DONG et al., 2010). Stämme von *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. sowie *Streptococcus* (*S.*) *thermophilus* zeigen außerdem anti-inflammatorische Wirkungen auf den Darm (DONG et al., 2012; ASHRAF und SHAH, 2014). Auch eine vermehrte Antikörper-Produktion (IgA) aus Plasmazellen durch den Einfluss probiotischer Stämme konnte beobachtet werden (FUKUSHIMA et al., 1998; PARK et al., 2002; IBNOU-ZEKRI et al., 2003).

Das Probiotikum, das in der vorliegenden Studie verwendet wurde (*L. plantarum* DSM 24730, *S. thermophilus* DSM 24731, *B. breve* DSM 24732, *L. paracasei* DSM 24733, *L. delbrueckii* subspecies *bulgaricus* DSM 24734, *L. acidophilus* DSM 24735, *B. longum* 120 DSM 24736, *B. infantis* DSM 24737), zeigte in vorherigen Studien einen anti-inflammatorischen Effekt. So zeigte sich unter anderem bei Mäusen mit induzierter Kolitis, die mit diesem Probiotikum behandelt wurden, dass dies mit einer signifikanten Minderung der Makrophagen-Akkumulation in den mesenterialen Lymphknoten assoziiert war (BASSAGANYA-RIERA et al., 2012).

Ergebnisse einer weiteren Studie zeigten eine Zunahme regulatorischer CD4⁺-T-Lymphozyten sowie eine vermehrte Produktion von Interleukin-10 (DI GIACINTO et al., 2005).

Bei Hunden kann durch probiotische Therapie sowohl eine Reaktion des erworbenen, als auch des unspezifischen Immunsystems beobachtet werden. So konnte in Biopsien des Duodenums von Hunden mit chronischer Enteropathie, die *ex vivo* mit *L. acidophilus* NCC2628 und NCC2766 sowie *L. johnsonii* NCC2767 inkubiert wurden, ein Einfluss auf das Verhältnis von regulatorischen zu inflammatorischen Zytokinen beobachtet werden (SAUTER et al., 2005). Hunde, die eine Staupe-Impfung erhielten und zusätzlich über ein Jahr mit 5×10^8 KBE *E. faecium* SF68 behandelt wurden, wiesen im Plasma eine signifikant höhere Konzentration der Staupevirus-Impfung-spezifischen IgA und Immunglobulin G (IgG) im Vergleich zur nicht behandelten Gruppe auf (BENYACOUB et al., 2003). In einer *In-vivo*-Studie bei gesunden Hunden, die einmalig mit *E. faecalis* FK-23 behandelt wurden, zeigte sich darauf eine Stimulation des unspezifischen Immunsystems, die sich unter anderem in gesteigerter neutrophiler Phagozytose äußerte (KANASUGI et al., 1997).

2.4.3. Unterstützung der Darmbarriere

Probiotika können die Bildung sogenannter Heat-Shock-Proteine induzieren, die dazu beitragen, Tight-Junction-Proteine zwischen Epithelzellen zu erhalten und somit die Darmbarriere positiv zu unterstützen (THOMAS und VERSALOVIC, 2010). Auch ein direkter Einfluss auf die Expression von Genen, die in die Tight-Junction-Protein-Bildung involviert sind, konnte gezeigt werden (ANDERSON et al., 2010). Indem probiotische Stämme einen Einfluss auf Zellteilung und Apoptose intestinaler Epithelzellen haben und außerdem zur Aufrechterhaltung der intestinalen Schleimschicht beitragen, fördern sie zudem die Darmbarriere (MACK et al., 2003). Auch für das in der vorliegenden Studie angewendete Probiotikum konnten Wirkmechanismen gezeigt werden, die zu einer verbesserten intestinalen Barriere beitragen. Bei Mäusen mit induzierter Ileitis konnte das Probiotikum die parazelluläre Permeabilität im Ileum mindern (CORRIDONI et al., 2012). Zudem konnte es in einem weiteren Mäuseversuch die Zerstörung der Darmbarriere sowie die Translokation von Bakterien aus dem Darm im Rahmen eines Sepsis-Modells verhindern (EWASCHUK et al., 2007).

2.4.4. Bereitstellung von Nährstoffen

Probiotische Organismen sind in der Lage Nährstoffe zu produzieren, die dann dem Wirt zur Verfügung stehen. So können einige bakterielle Stämme vor allem Kohlenhydrate aus der Nahrung fermentieren und dadurch SCFA bilden, wozu der Wirtsorganismus alleine nicht in der Lage ist (NAGPAL et al., 2018). Die SCFA haben neben ernährungsphysiologischem Nutzen, indem sie z. B. die Sättigung regulieren, auch vielfältige positive Effekte auf den Gastrointestinaltrakt, indem sie z. B. anti-entzündlich wirken, die Darmbarriere positiv unterstützen, als Energiequelle für Enteroozyten dienen, die Motilität des Darms beeinflussen und durch pH-Wert-Senkung die Vermehrung pH-sensitiver Pathogene hemmen (CHERRINGTON et al., 1991; WANG et al., 2012; ARPAIA et al., 2013; PEDERSEN et al., 2013; SMITH et al., 2013; KIM et al., 2014). Zu weiteren Nährstoffen, die von probiotischen Bakterienstämmen gebildet werden können, zählen z. B. B-Vitamine, wie Folsäure und Vitamin B12, sowie Vitamin K (LEBLANC et al., 2011).

2.4.5. Modulation des Mikrobioms

Neben dem Einfluss auf pathogene Keime konnte in einigen Studien auch der Einfluss von Probiotika auf die ansässige Mikrobiota gezeigt werden, wobei unterschiedliche Effekte beobachtet werden konnten. Hierbei zeigte sich z. B., dass eine probiotische Therapie mit einer stabileren Mikrobiota während des Behandlungszeitraumes assoziiert war (COX et al., 2010; KI CHA und I., 2011). In einer weiteren Studie wurde bei Mäusen während der probiotischen Therapie ein vielfältigeres Mikrobiom beobachtet (PREIDIS et al., 2012). Dagegen führte das in der vorliegenden Studie verwendete Probiotikum in einer Studie an Mäusen mit induzierter Kolitis zu einer reduzierten bakteriellen Vielfalt im Kolon (BASSAGANYA-RIERA et al., 2012). Auch eine Behandlung mit verschiedenen Milchsäurebakterien führte bei gesunden Hunden zu einer reduzierten Vielfalt der Milchsäurebakterien im Dünndarm, die auch nach Absetzen des Probiotikums anhielt (MANNINEN et al., 2006). Weiterhin konnten in einigen Studien regelmäßig die verabreichten Bakterienstämme bzw. -arten, die im probiotischen Präparat enthalten waren, in erhöhter Menge im Kot detektiert werden, was als Zeichen der gastrointestinalen Passage des Bakteriums gewertet wurde (STROMPFOVA et al., 2006; KELLEY et al., 2012).

2.5. Einsatz bei gastrointestinalen Erkrankungen bei Hunden

Es wurden bei verschiedenen gastrointestinalen Erkrankungen von Hunden bereits Studien zur Effektivität von Probiotika-Therapien durchgeführt, wobei in einigen ein positiver Einfluss auf klinische Symptome gezeigt werden konnte. In wenigen Studien wurden, neben der Evaluation der klinischen Symptomatik, zudem auch das intestinale Mikrobiom, immunmodulatorische Effekte oder z. B. Marker für die intestinale Barriere untersucht. Wichtig ist zu unterscheiden, ob Studien mit einem reinen Probiotikum oder einem Synbiotikum durchgeführt wurden, da letztendlich nicht festgestellt werden kann, ob eine Wirkung auf das enthaltene Probiotikum, Präbiotikum oder beide zurückzuführen ist.

2.5.1. Akute Enteropathien

In Studien zu probiotischer Behandlung bei Hunden mit akuten Enteropathien wurde sowohl der prophylaktische, als auch der therapeutische Effekt untersucht.

2.5.1.1. Akute unkomplizierte Diarrhoe

Akuter unkomplizierter Durchfall tritt häufig in stress-assoziierten Situationen, wie z. B. während eines Tierheimaufenthalts, auf und stellt einen häufigen Vorstellungsgrund für Hunde beim Tierarzt dar (SOKOLOW et al., 2005; JONES et al., 2014). In der Tiermedizin gibt es einige Studien, die einen positiven Effekt einer Probiotika-Therapie bei akutem unkompliziertem Durchfall des Hundes zeigen konnten.

Bei 134 Hunden, die einmal täglich über acht Wochen variierende Dosierungen ($< 10^3$, $1,5 \times 10^7$, $1,5 \times 10^8$ oder $1,5 \times 10^9$ KBE) eines Probiotikums mit *B. animalis* AHC7 erhielten, wurde der Einfluss auf die Kotkonsistenz, die tägliche Kotabsatzfrequenz und die Anzahl der Durchfallepisoden evaluiert. Es zeigte sich, dass Hunde, die $1,5 \times 10^7$, $1,5 \times 10^8$ oder $1,5 \times 10^9$ KBE erhielten, eine signifikant bessere Kotkonsistenz sowie signifikant weniger Durchfallepisoden hatten als die Hunde, die nur $< 10^3$ KBE erhielten. Mittels qPCR zeigte sich außerdem, dass die Anzahl an fäkalen *B.-animalis*-AHC7-Stämmen signifikant bei Hunden stieg, die $1,5 \times 10^7$, $1,5 \times 10^8$ oder $1,5 \times 10^9$ KBE erhielten. Je höher die orale Dosierung war, desto höhere Mengen *B. animalis* AHC7 konnten im Kot detektiert werden. Ein Effekt auf fäkale *E. coli* und *C. perfringens* durch das Probiotikum konnte nicht beobachtet werden (KELLEY et al., 2012). KELLEY und Mitarbeiter (2009) untersuchten zudem in einer weiteren geblindeten placebokontrollierten Studie bei

31 Hunden, die aufgrund von akutem unkompliziertem Durchfall dem Tierarzt vorgestellt wurden, die Wirkung eines einstämmigen Probiotikums mit 1×10^{10} KBE *B. animalis* AHC7, das zweimal täglich über zwei Wochen oder bis zur Remission des Durchfalls verabreicht wurde. Hierbei wurden von den Autoren keine genaueren Angaben zur Länge der Probiotika-Therapie gemacht. Die Patienten erhielten, je nach Häufigkeit des Durchfalls, nach Verschlechterung der Kotkonsistenz, nach Verschlechterung des allgemeinen Gesundheitszustandes und je nachdem, ob Hunde in der näheren Umgebung des Patienten auch Durchfall entwickelten, nach Entscheidung des behandelnden geblindeten Tierarztes zusätzlich das Antibiotikum Metronidazol. Es zeigte sich, dass die Dauer des Durchfalls bei Patienten in der Probiotika-Gruppe signifikant kürzer war, mit $3,9 \pm 2,3$ versus $6,6 \pm 2,7$ Tagen. Zudem wurde Metronidazol bei weniger Patienten der Probiotika-Gruppe (5/13; 38,5 %) eingesetzt, verglichen mit der Placebo-Gruppe (9/18; 50,0 %). Bei Hunden ($n = 25$), die mit akutem unkompliziertem Durchfall einem Tierarzt vorgestellt wurden und über sieben Tage einmal täglich zwei Deziliter eines pasteurisierten Sauermilchproduktes mit 2×10^9 KBE *L. fermentum* VET 9A, *L. rhamnosus* VET 16A und *L. plantarum* VET 14A pro Milliliter erhielten, konnte im Verlauf der Studie verglichen mit der Placebo-Gruppe ($n = 19$) eine signifikant bessere Kotkonsistenz beobachtet werden. Weiterhin zeigte in der Probiotika-Gruppe kein Hund Erbrechen, während in der Placebo-Gruppe 23 % der Patienten, und somit signifikant mehr, erbrachen. In dieser Studie wurden außerdem mittels qPCR die gesamte Bakterienzahl sowie die Menge von 17 Bakterienspezies in Kotproben vor der Studie sowie nach sieben Tagen untersucht und innerhalb der Gruppen verglichen. Hierbei zeigte sich, dass Alphatoxin-produzierende *C. perfringens* sowie *E. faecium* in der Probiotika-Gruppe signifikant stärker sanken verglichen mit der Placebo-Gruppe. Für weitere Bakterienspezies konnten keine signifikanten Veränderungen erfasst werden (GOMEZ-GALLEGO et al., 2016). HERSTAD und Mitarbeiter (2010) evaluierten in einer placebokontrollierten Studie bei 36 Hunden, die mit akutem unkompliziertem Durchfall in einer Tierarztpraxis vorgestellt wurden, den Effekt eines mehrstämmigen Probiotikums, mit $2,85 \times 10^9$ KBE *L. farciminis*, *Pediococcus acidilactici*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* und $1,35 \times 10^9$ KBE *L. acidophilus* MA 64/4E, ohne genaue Angabe der verwendeten Stämme, das dreimal täglich dosiert nach Gewicht verabreicht wurde. Hierbei zeigte sich, dass die Dauer des Durchfalls in der Probiotika-Gruppe signifikant kürzer verlief mit

einer mittleren Dauer von 1,3 (0,5 – 2,1) Tagen versus 2,2 (1,3 – 3,1) Tagen in der der Placebo-Gruppe.

Bei 20 gesunden Schlittenhunden, die mit einem Synbiotikum ($5,67 \times 10^8$ KBE *E. faecium* SF68; $3,75 \times 10^8$ KBE *Bacillus coagulans*, $7,2 \times 10^8$ KBE *L. acidophilus* sowie verschiedenen Präbiotika) oder Placebo über sechs Wochen behandelt wurden, wurde der Einfluss auf das Auftreten von Durchfall, die Kotkonsistenz, die Menge fäkaler SCFA und das fäkale Mikrobiom untersucht. Hierbei wiesen Hunde in der Synbiotika-Gruppe eine signifikant niedrigere Anzahl an Tagen mit Durchfall auf. Weiterhin konnten, im Gegensatz zur Placebo-Gruppe, ein signifikanter Anstieg der Lactobacillaceae mittels 16S-rRNA-Sequenzierung sowie ein signifikanter Anstieg der *Lactobacillus* spp. und *Bifidobacterium* spp. mittels qPCR in der Synbiotika-Gruppe festgestellt werden. Hinsichtlich der SCFA konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen beobachtet werden (GAGNE et al., 2013). Eine weitere Studie zu einem möglichen prophylaktischen Effekt eines Synbiotikums gegenüber Placebo wurde von ROSE und Mitarbeitern (2017) an 773 Hunden, die in einem Tierheim untergebracht waren, untersucht, indem die Inzidenz von Durchfall sowie die Kotkonsistenz der Tiere evaluiert wurden. Die Studienteilnehmer erhielten über die Länge des Aufenthaltes im Tierheim einmal täglich 2×10^9 KBE *E. faecium* NCIMB 10415 4b1707 sowie ein Präbiotikum bestehend aus Fruktooligosacchariden und Gummi arabicum. Der Anteil der Tage, an denen Durchfall auftrat, sowie der Anteil der Tiere pro Gruppe, die bis zum Studientag 14 eine Durchfallepisode zeigten, die länger als zwei Tage anhielt, war in der Synbiotika-Gruppe signifikant geringer.

Im Gegensatz dazu gibt es außerdem Studien, bei denen kein Effekt durch ein Probiotikum auf den Verlauf von akutem unkompliziertem Durchfall beobachtet werden konnte. BYBEE und Mitarbeiter (2011) untersuchten in einer doppelgeblindeten, placebokontrollierten Studie, ob ein einstämmiges Präparat mit $2,1 \times 10^9$ KBE *E. faecium* SF68 bei Hunden und Katzen im Tierheim einen Einfluss auf das Auftreten von Durchfall sowie die Länge etwaiger Durchfallepisoden hat. Hierfür wurden getrennte Räumlichkeiten für die jeweilige Therapie eingerichtet. Die Tiere erhielten das Probiotikum oder das Placebo oral über vier Wochen, gefolgt von einer Woche ohne Therapie und dann weiteren vier Wochen mit der gegenteiligen Behandlung. Hierbei zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich Prävalenz von Durchfall oder Länge der Durchfallepisoden zwischen den

Studiengruppen, wobei in beiden Gruppen nur selten Durchfall auftrat und nur jeweils nur ein Studienpatient in jeder Gruppe länger als zwei Tage Durchfall zeigte.

2.5.1.2. Parvovirose

Bei 20 Welpen mit Parvovirose wurde zusätzlich zur Standardtherapie, bestehend aus intravenöser Flüssigkeitssubstitution, antibiotischer Therapie mit Ampicillin und/oder Gentamycin, Metoclopramid und Vitaminsupplementierung, die Wirkung des gleichen mehrstämmigen Probiotikums, das in der vorliegenden Studie verwendet wurde, mit 450×10^9 KBE *L. plantarum* DSM 24730, *S. thermophilus* DSM 24731, *B. breve* DSM 24732, *L. paracasei* DSM 24733, *L. delbrueckii* subspecies *bulgaricus* DSM 24734, *L. acidophilus* DSM 24735, *B. longum* DSM 24736 und *B. infantis* DSM 24737, versus Placebo über mindestens eine bis maximal drei Wochen evaluiert. Hierbei wurde nicht angegeben warum der Zeitraum der Verabreichung zwischen den Studienteilnehmern nicht einheitlich war. Es zeigte sich eine signifikant stärkere Verbesserung des Krankheitsaktivitätsindex in der Probiotika-Gruppe. Weiterhin wurden fünf Tage nach Therapiestart signifikant höhere Leukozytenzahlen, insbesondere Lymphozytenzahlen, im Blut der mit dem Probiotikum behandelten Welpen festgestellt (ARSLAN et al., 2012).

2.5.2. Chronische Enteropathien

Die vorliegenden Studien zum Probiotika-Einsatz bei chronischen Enteropathien konzentrieren sich in der Tiermedizin vor allem auf die probiotische Therapie bei Hunden mit IBD.

2.5.2.1. Futtermittel-responsive Enteropathie

Bei sechs Hunden mit futtermittel-responsiver Enteropathie, die über zwölf Wochen mit einer standardisierten Diät und 6×10^6 KBE *L. acidophilus* DSM 13241 mit vorheriger und nachfolgender Kontrollphase ohne Probiotikum gefüttert wurden, konnte gezeigt werden, dass sich die Kotkonsistenz in der Probiotika-Phase signifikant besserte. Weiterhin zeigten die Studienteilnehmer in den Phasen ohne Probiotikum signifikant häufiger Durchfall sowie häufiger mehr als zwei tägliche Kotabsätze (PASCHER et al., 2008). SAUTER und Mitarbeiter (2006) untersuchten in einer placebokontrollierten Studie den Einfluss eines mehrstämmigen Probiotikums mit 10^{10} KBE *L. acidophilus* NCC2628, 10^{10} KBE

L. acidophilus NCC2766 und 10^{10} KBE *L. johnsonii* NCC2767, das einmal täglich über vier Wochen parallel zu einer standardisierten Eliminationsdiät bei 21 Hunden mit futtermittel-responsiver Enteropathie angewendet wurde. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Krankheitsaktivitätsindex, des Körpergewichtes und fäkaler Zytokine zwischen den Gruppen festgestellt werden. In einer placebokontrollierten Studie wurde zudem der Einfluss eines einmal täglich über 42 Tage verabreichten Synbiotikums mit 1×10^9 KBE *E. faecium* NCIMB 10415 4b1707 und Fruktooligosacchariden, sowie Gummi arabicum mit zeitgleicher Fütterung einer hydrolisierten Diät bei zwölf Hunden mit futtermittel-responsiver Enteropathie untersucht. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied im Krankheitsaktivitätsindex, in der Expression verschiedener Zytokine sowie der Histopathologie von Duodenum und Kolon zwischen den Gruppen gezeigt werden (SCHMITZ et al., 2015).

2.5.2.2. Antibiotika-responsive Enteropathie

Bei neun Hunden mit antibiotika-responsiver Enteropathie, die auf Tylosin eine vollständige Remission der gastrointestinalen Symptome zeigten, wurde von WESTERMARCK und Mitarbeitern (2005) untersucht, in wie fern eine Behandlung mit 5×10^9 KBE *L. rhamnosus* GG zweimal täglich für bis zu 30 Tage verglichen mit keinerlei Therapie eine Rückkehr der Symptome nach Absetzen des Tylosins verhindern kann. Innerhalb von drei bis 26 Tagen (im Median sieben) zeigten alle neun Hunde unabhängig von der Therapie erneut Durchfall ohne einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Kotkonsistenz zwischen den Gruppen.

2.5.2.3. Steroid-responsive Enteropathie

ROSSI und Mitarbeiter (2014) verglichen eine Einzeltherapie mit dem gleichen Probiotikum, das in der vorliegenden Studie verwendet wurde ($112 - 225 \times 10^9$ KBE pro 10kg Körpergewicht *L. plantarum* DSM 24730, *S. thermophilus* DSM 24731, *B. breve* DSM 24732, *L. paracasei* DSM 24733, *L. delbrueckii* subspecies *bulgaricus* DSM 24734, *L. acidophilus* DSM 24735, *B. longum* DSM 24736 und *B. infantis* DSM 24737), mit einer Kombinationstherapie aus Prednison und Metronidazol bei 20 Hunden mit IBD über 60 Tage. Unter beiden Therapieformen konnte eine signifikante klinische Besserung verzeichnet werden. In der Prednison/Metronidazol-Gruppe stellte sich die Besserung signifikant schneller ein, mit einer medianen Zeit von 4,8 (von 2,5 bis 7,0) Tagen bis zur Remission, während

die mediane Zeit in der Probiotika-Gruppe 10,6 (von 5,0 bis 15,0) Tage betrug. In beiden Gruppen kam es zudem zu einer signifikanten Besserung des histologischen Scores der Darmbiopsien, ohne Unterschied zwischen den Studiengruppen. Es zeigte sich zudem, dass es in beiden Studiengruppen zu einer gleichermaßen signifikanten Abnahme der CD3+-T-Lymphozyten sowie zu einer signifikant stärkeren Expression von TGF- β -Zellen kam, wobei diese bei Hunden in der Probiotika-Gruppe signifikant stärker war. Zudem zeigte sich nur in der Probiotika-Gruppe ein signifikanter Anstieg der FoxP3+-Zellen. Das Tight-Junction-Protein Occludin war bei Hunden, die mit dem Probiotikum behandelt wurden, sowie bei gesunden Kontrollhunden signifikant stärker exprimiert als bei Hunden in der Prednison/Metronidazol-Gruppe, während das Tight-Junction-Protein Claudin-2 im Kolon der Prednison/Metronidazol-Gruppe signifikant stärker exprimiert war als bei gesunden Kontrollhunden und Hunden, die das Probiotikum erhielten. Anhand dieser Ergebnisse wurde geschlussfolgert, dass das verwendete Probiotikum anti-inflammatorische Wirkung hat und sich positiv auf die Darmbarriere auswirkt. In einer qPCR konnte außerdem gezeigt werden, dass fäkale *Faecalibacterium* spp. in der Probiotika-Gruppe signifikant stiegen. ROSSI und Mitarbeiter (2018) führten eine weitere Studie zu Probiotika-Therapie mit dem gleichen Probiotikum in gleicher Dosierung über 60 Tage ohne weitere Therapie bei zehn Hunden mit IBD sowie fünf Hunden mit Kolonpolypen ohne Kontrollgruppe durch. Es zeigte sich eine signifikante Verbesserung des Krankheitsaktivitätsindex und des histologischen Scores bei Hunden mit IBD. Zudem wurde in der Studie beobachtet, dass es bei Hunden mit IBD zu einer gesteigerten Expression von Polyaminen kam, während bei Hunden mit Kolonpolypen eine verminderte Expression von Polyaminen festgestellt werden konnte. Dieses Ergebnis wurde als anti-proliferativer Effekt im Rahmen der Kolonpolypen und anti-inflammatorischer Effekt bei Hunden mit IBD interpretiert. In einer Studie von WHITE und Mitarbeitern (2017) erhielten 34 Hunde mit IBD, die zuvor auf einen Diätwechsel oder antibiotische Therapie allein nicht angesprochen hatten, entweder eine Kombinationstherapie aus Prednison, Diät und dem gleichen Probiotikum, das in der vorliegenden Studie verwendet wurde (mit 450×10^9 KBE), oder Prednison, Diät und Placebo über acht Wochen. Patienten in beiden Therapiegruppen zeigten eine signifikante Verbesserung des Krankheitsaktivitätsindex, ohne Unterschied zwischen den Gruppen. Unter beiden Therapiemethoden konnte ein Anstieg der gesamten Bakterienzahl im Kot

mittels qPCR beobachtet werden. In der Probiotika-Gruppe konnte zudem eine hochregulierte Expression der Tight-Junction-Proteine E-Cadherin, Occludin und Zonulin gezeigt werden, was als Hinweis auf eine verbesserte Darmbarriere interpretiert wurde. D'ANGELO und Mitarbeiter (2018) untersuchten die Wirkung des Hefepilzes *Saccharomyces boulardii* mit 1×10^9 KBE/kg versus Placebo zweimal täglich bei 20 Hunden mit IBD, von denen acht Hunde zusätzlich einen Proteinverlust über den Darm zeigten, als Zusatz zu Diät, antibiotischer Therapie und Steroiden über einen Zeitraum von 60 Tagen. Während es in beiden Gruppen zu einer signifikanten Abnahme des Krankheitsaktivitätsindex kam, zeigten Hunde die zusätzlich *Saccharomyces boulardii* erhielten, eine signifikant schnellere Verbesserung sowie einen signifikant niedrigeren Krankheitsaktivitätsindex nach 45 und 60 Tagen unter Therapie. Zudem zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Body-Condition-Scores in der Probiotika-Gruppe. Ein Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich des Eiweißverlustes konnte nicht gefunden werden.

2.5.3. Endoparasitosen

Bei 20 Hunden mit Ancylostomatidae-Infektion, die einmal täglich 1×10^6 KBE *L. acidophilus* ATCC 4536, *L. plantarum* ATCC 8014 und *L. delbrueckii* UFV H2B20 erhielten, konnte gezeigt werden, dass diese im Vergleich zu nicht behandelten Hunden signifikant höhere Erythrozytenzahlen aufwiesen. Weiterhin wurden in der mit Probiotikum behandelten Gruppe höhere Leukozytenzahlen sowie eine signifikant reduzierte Ausscheidung von Parasiteneiern gemessen (COELHO et al., 2013). SIMPSON und Mitarbeiter (2009) untersuchten den Effekt von 5×10^8 KBE *E. faecium* SF68 versus Placebo einmal täglich über sechs Wochen auf die Ausscheidung von Giardienzysten, fäkales Giardien-Antigen sowie fäkales IgA bei 20 Hunden mit chronischer subklinischer Giardieninfektion. Hierbei konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden.

2.5.4. Antibiotika-assoziierte Nebenwirkungen

Viele Hunde zeigen während antibiotischer Therapie gastrointestinale Nebenwirkungen, wie z. B. Durchfall, Erbrechen und Hyporexie (OLSON et al., 2015; WHITTEMORE et al., 2019).

FENIMORE und Mitarbeiter (2017) untersuchten die Auswirkungen einer Metronidazolbehandlung mit oder ohne probiotische Begleittherapie (5×10^8 KBE

E. faecium SF 68) einmal täglich über sieben Tage bei 32 Hunden mit unkompliziertem Durchfall im Tierheim. Der Anteil der Tage mit normalem Kotabsatz war in der Probiotika-Gruppe (65,6 %) signifikant höher als in der Gruppe, die nur Metronidazol (46,9 %) erhielt. SINAN AKTAS und Mitarbeiter (2007) untersuchten den Effekt eines Hefe-Probiotikums mit 1000 mg *Saccharomyces boulardii* pro Tag über 10 Tage bei 24 gesunden Hunden, die intramuskulär Lincomycin erhielten. Hierbei erhielten die ersten beiden von drei Studiengruppen Lincomycin so lange bis sich Durchfall einstellte. Während die erste Gruppe keine weitere Therapie erhielt, bekam die zweite Gruppe das Probiotikum sobald sich der Durchfall einstellte. Bei der dritten Studiengruppe wurde zeitgleich zur Antibiotikatherapie mit dem Probiotikum gestartet. In der Gruppe, die nur Lincomycin erhielt, entwickelten 75 % der Patienten Durchfall, mit einer mittleren Dauer von 6,5 Tagen. Die Durchfalldauer war in der Studiengruppe, die *Saccharomyces boulardii* erhielt, sobald der Durchfall begann, signifikant kürzer, mit einer mittleren Dauer von 2,9 Tagen, während in der dritten Studiengruppe keiner der Studienpatienten Durchfall entwickelte. Bei 22 gesunden Hunden, die parallel zu einer antibiotischen Therapie bestehend aus Enrofloxacin und Metronidazol ein Synbiotikum mit 1×10^{10} KBE *B. bifidum*, *E. faecium*, *S. thermophilus*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei* und *L. plantarum*, sowie 1×10^{10} KBE *Saccharomyces boulardii* und dem Präbiotikum Beta-Glucan erhielten, wurde in einer placebokontrollierten Cross-Over-Studie der Einfluss auf das Auftreten von antibiotika-assoziierten Nebenwirkungen untersucht. Hunde, die parallel zur antibiotischen Therapie das Placebo erhielten, zeigten eine signifikant niedrigere Futteraufnahme sowie eine schlechtere Kotkonsistenz verglichen mit Hunden, die synbiotisch behandelt wurden (WHITTEMORE et al., 2019).

III. PUBLIKATION

**Effect of probiotic treatment on the clinical course, intestinal microbiome,
and toxigenic *Clostridium perfringens* in dogs with acute hemorrhagic
diarrhea**

Anna-Lena Ziese¹, Jan S. Suchodolski², Katrin Hartmann¹, Kathrin Busch¹,
Alexandra Anderson¹, Fatima Sarwar², Natalie Sindern¹, Stefan Unterer¹

¹ Clinic of Small Animal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine,
LMU Munich, Veterinaerstrasse 13, 80539 Munich, Germany

² Gastrointestinal Laboratory, Department of Small Animal Clinical Sciences,
Texas A&M University, 4474 TAMU, College Station, TX 77845, USA

Online veröffentlicht in „PLOS ONE“ am 27.09.2018

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204691>

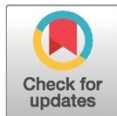
RESEARCH ARTICLE

Effect of probiotic treatment on the clinical course, intestinal microbiome, and toxigenic *Clostridium perfringens* in dogs with acute hemorrhagic diarrhea

Anna-Lena Ziese^{1*}, Jan S. Suchodolski², Katrin Hartmann¹, Kathrin Busch¹, Alexandra Anderson¹, Fatima Sarwar², Natalie Sindern¹, Stefan Unterer¹

1 Clinic of Small Animal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine, LMU Munich, Munich, Germany, **2** Gastrointestinal Laboratory, Department of Small Animal Clinical Sciences, Texas A&M University, TAMU, College Station, Texas, United States of America

* a.ziese@medizinische-kleintierklinik.de



Abstract

OPEN ACCESS

Citation: Ziese A-L, Suchodolski JS, Hartmann K, Busch K, Anderson A, Sarwar F, et al. (2018) Effect of probiotic treatment on the clinical course, intestinal microbiome, and toxigenic *Clostridium perfringens* in dogs with acute hemorrhagic diarrhea. PLoS ONE 13(9): e0204691. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204691>

Editor: Leandro Araujo Lobo, Universidade Federal do Rio de Janeiro, BRAZIL

Received: April 14, 2018

Accepted: September 11, 2018

Published: September 27, 2018

Copyright: © 2018 Ziese et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The study was funded by resources of the Clinic of Small Animal Internal Medicine of the LMU University of Munich, Germany. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Introduction

The impact of probiotics on dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome (AHDS) has not been evaluated so far. The study aim was to assess the effect of probiotic treatment on the clinical course, intestinal microbiome, and toxigenic *Clostridium perfringens* in dogs with AHDS in a prospective, placebo-controlled, blinded trial.

Methods

Twenty-five dogs with AHDS with no signs of sepsis were randomly divided into a probiotic (PRO; Visbiome, ExeGi Pharma) and placebo group (PLAC). Treatment was administered for 21 days without antibiotics. Clinical signs were evaluated daily from day 0 to day 8. Key bacterial taxa, *C. perfringens* encoding *NetF* toxin and enterotoxin were assessed on days 0, 7, 21.

Results

Both groups showed a rapid clinical improvement. In PRO a significant clinical recovery was observed on day 3 ($p = 0.008$), while in PLAC it was observed on day 4 ($p = 0.002$) compared to day 0. Abundance of *Blautia* ($p < 0.001$) and *Faecalibacterium* ($p = 0.035$) was significantly higher in PRO on day 7 compared to day 0, while in PLAC the abundance of *Faecalibacterium* was not significantly higher on any study day and *Blautia* ($p = 0.016$) was only significantly higher on day 21 compared to day 0. Abundance of *C. perfringens* was significantly lower on day 7 ($p = 0.011$) compared to day 0 in PRO but not in PLAC. Enterotoxin genes were significantly lower in PRO on day 21 ($p = 0.028$) compared to PLAC. Fecal samples of 57% of all dogs were positive for *netF* toxin genes on day 0 and the abundance was significantly lower on day 7 compared to day 0 in PRO ($p = 0.016$) and PLAC ($p = 0.031$).

Competing interests: The probiotic (trade name Vivomixx®) was provided by the company MENDES S.A. (Via Giacometti, 1, 6900 Lugano Switzerland). ALZ received travel support from MENDES S.A. to travel to an international conference. JSS has received consulting fees from ExeGi Pharma. This does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

Conclusion

The probiotic treatment was associated with an accelerated normalization of the intestinal microbiome. Dogs with aseptic AHDS showed a rapid decrease of *netF* toxin genes and fast clinical recovery in both groups under symptomatic treatment without antibiotics.

Introduction

Acute hemorrhagic diarrhea syndrome (AHDS) is a common complaint in dogs presented to primary care veterinarians. The etiology is not fully understood, but there is strong evidence that *C. perfringens* and its toxins play a role in the pathogenesis and are responsible for the intestinal lesions in most dogs diagnosed with AHDS [1]. An increase in fecal abundance of enterotoxigenic *C. perfringens* has been associated with acute non-hemorrhagic as well as with hemorrhagic diarrhea [2, 3]. Nevertheless, there was no difference found in severity of clinical or laboratory parameters between dogs with AHDS that were either positive or negative for *C. perfringens* encoding enterotoxin [3]. Recently, novel pore-forming toxins designated as *NetE* and *NetF* were identified in a *C. perfringens* type A strain isolated from a dog with acute hemorrhagic diarrhea, and the cytotoxic effect of *NetF* could be demonstrated *in vitro* [4]. In addition, there is a significantly higher prevalence of *C. perfringens* encoding *NetF* toxin (*netF*) in canine AHDS isolates compared to undifferentiated canine diarrheal isolates [4], and a preliminary study also showed a significant higher abundance of *netF* in dogs with AHDS compared to healthy dogs or dogs with parvovirus [5].

The clinical picture of AHDS is characterized by acute onset of hemorrhagic diarrhea, lethargy, dehydration, and anorexia. Due to massive fluid loss, dogs with AHDS quickly develop hypovolemia, which can be potentially life threatening when untreated. Usually, a rapid clinical improvement under symptomatic treatment with aggressive fluid therapy, antiemetic therapy, analgetics, and gastrointestinal diet can be seen. Short-term prognosis is considered good after successful treatment of hypovolemia, while long-term consequences of the severe mucosal damage in dogs with AHDS are currently not known. Two individual studies have shown that treatment with antibiotics has no significant influence on mortality rate, duration of hospitalization, and clinical signs, and antibiotic treatment should be restricted to dogs with signs of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) or inadequate response to symptomatic therapy [6, 7]. This is even more of interest since antibiotic treatment can cause acute alterations in the intestinal microbiome and some bacterial taxa even remain altered for months after antibiotic treatment [8, 9]. Moreover, inappropriate use of antibiotics promotes the development of antimicrobial resistance, which poses a major problem in health care [10].

Dogs with AHDS have alterations in the intestinal microbiome, for example increases in *C. perfringens*-like sequences and *Fusobacteria* and decreases in *Actinobacteria* and members within the *Firmicutes* (*Ruminococcaceae*, *Blautia* spp.) [11, 12].

Recently, a quantitative PCR-based dysbiosis index (DI) was developed to identify dysbiosis in canine fecal samples and this assay also allows to track microbiota changes over time [13]. The DI quantifies the abundance of total bacteria as well as of seven bacterial taxa (i.e. *Faecalibacterium*, *Turicibacter*, *E. coli*, *Streptococcus*, *Blautia*, *Fusobacterium* and *C. hiranonis*) shown to be altered in dogs with gastrointestinal disease in previous sequencing and qPCR-based studies. A recent study in dogs with multicentric lymphoma showed that the DI reflects the microbiota dysbiosis similarly as whole microbiota analysis by 16S rRNA gene sequencing [14]. The DI has been shown to be reproducible and provides a reference interval, based on

assessment of the fecal microbiota of 95 healthy dogs [13]. The DI is expressed as a single numeric value and has shown to be negative in healthy dogs (mean DI -4.8) and positive in dogs with gastrointestinal disease (mean DI 3.3 in dogs with chronic enteropathy) indicating dysbiosis. However, it has been shown that there is an overlap of dysbiosis patterns between healthy dogs and dogs with gastrointestinal disease, which is why dogs with gastrointestinal disease may have normal microbiota and therefore negative DI.

Currently it is unclear whether the microbiota changes are in part causal or an effect of the disease, but it is believed that intestinal dysbiosis plays a role in the pathophysiology of acute and chronic disorders. Thus, a rapid normalization of microbiota dysbiosis might be beneficial.

Probiotics are orally administered live microorganisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host (FAO/WHO 2001). The exact mechanisms of probiotics are presently not fully understood, but several studies suggest that probiotics have different beneficial effects on host health, such as immunomodulation, anti-inflammatory properties or competition for nutrients or adhesion sites with potential pathogens [15, 16]. The effects of a probiotic possibly depend on the probiotic strain, mixture and concentration. A previous study for instance showed varying microbial changes in kennel dogs depending on the dosage of the probiotic treatment [17]. Several studies showed an improvement in clinical signs by probiotic treatment such as causing significant decreased incidence of diarrhea in sheltered dogs and a significant reduction in duration of uncomplicated acute diarrhea in dogs [18–20]. Dogs with idiopathic inflammatory bowel disease treated with probiotics in addition to standard therapy showed an enhancement of regulatory T-cell markers, normalization of dysbiosis, and up-regulated expression of tight junction proteins [21, 22]. One study investigated the effect of probiotic treatment on dogs with hemorrhagic diarrhea due to parvovirus and observed a more rapid improvement in clinical signs as well as in leukocyte counts in dogs additionally treated with probiotics [23]. However, to our knowledge there are no studies on probiotic treatment in dogs with AHDS and its impact on clinical signs and intestinal microbiota.

Thus, the aim of this prospective, placebo-controlled, randomized, blinded study was to evaluate whether treatment with a probiotic has an impact on the clinical course, the intestinal microbiome, and the presence and abundance of *C. perfringens* and *C. perfringens* encoding enterotoxin and *NetF* toxin in dogs with AHDS that show no signs of sepsis.

Material & methods

Patients

This study was a prospective, placebo-controlled, randomized, blinded treatment trial. It was conducted according to the German animal welfare law (approved by Ethics Commission, Centre for Clinical Veterinary Medicine, LMU Munich, Germany; reference number 9-20-06-13). Owners were informed about the purpose of the study, and all owners signed a written consent form. Between October 2013 and March 2015, 84 dogs were presented with acute hemorrhagic diarrhea to the Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Germany. AHDS was diagnosed by ruling out any disease that can potentially cause hemorrhagic diarrhea. Inclusion criterion to enter the study was the presence of acute onset of hemorrhagic diarrhea with or without vomiting lasting less than three days. Fig 1 illustrates the standardized examination process and exclusion criteria as well as the further course of the study as a flow-chart. Exclusion criteria were underlying diseases causing hemorrhagic diarrhea, pre-treatment with drugs known to cause mucosal irritation (e.g., non-steroidal anti-inflammatory drugs, corticosteroids, doxycycline) one week before presentation, or pre-

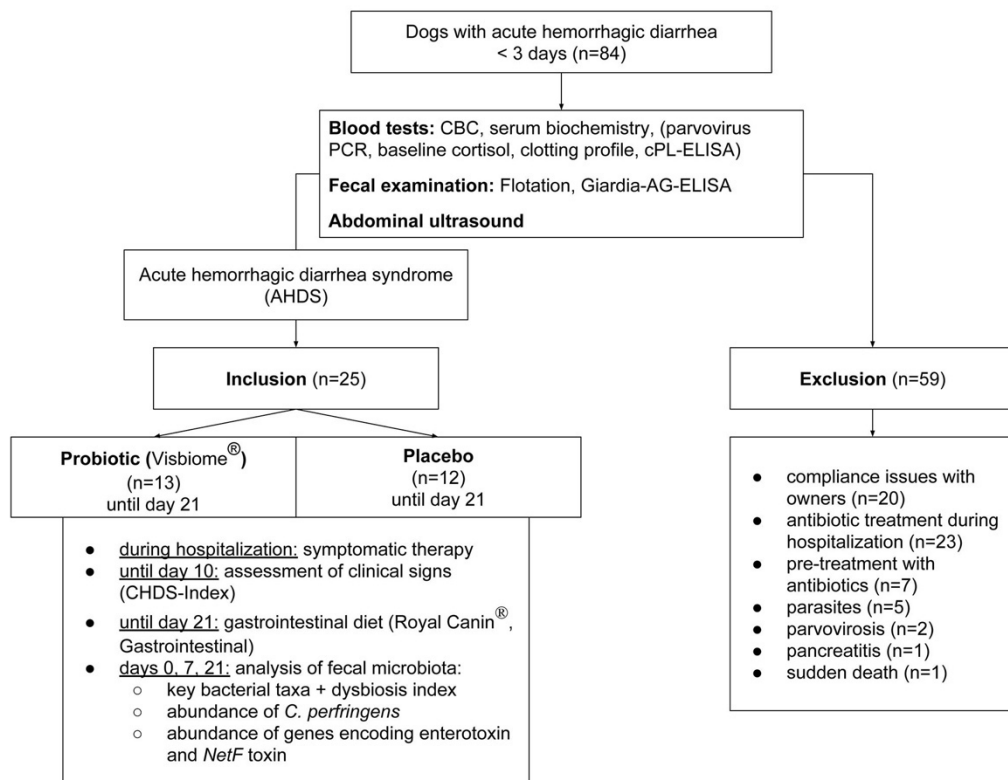


Fig 1. Standardized examination process and study protocol.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204691.g001>

treatment with antibiotics. Dogs diagnosed with AHDS but potential signs of sepsis (rectal temperature $>39.50^{\circ}\text{C}$, white blood cell (WBC) count <4 or $>25 \times 10^9/\text{L}$, band neutrophil count $>1.5 \times 10^9/\text{L}$) were also excluded.

Therefore, a standardized history and physical examination were taken, and various tests performed.

Blood tests. A complete blood count (CBC), serum biochemistry profile, serum concentrations of pancreatic lipase immunoreactivity (Spec cPL, IDEXX Laboratories, Ludwigsburg, Germany) and clotting profiles if required (packed cell volume $<40\%$ or suspicious history or physical examination) were evaluated. A parvovirus PCR (IDEXX Laboratories, Ludwigsburg, Germany) was performed in dogs in which an infection was considered likely (young age, incomplete vaccination history, neutropenia). Baseline cortisol (IDEXX Laboratories, Ludwigsburg, Germany) concentration was measured to rule out Addison's disease in dogs with lack of a stress leukogram and hyponatremia and/or hyperkalaemia.

Fecal examination. Flotation for nematodes and protozoan parasites (29.5% sodium nitrate flotation solution, Janssen-Cilag, Neuss, Germany) and a Giardia antigen ELISA (ProSpecT Giardia Microplate Assay; Remel Inc, Lenexa, KS) were evaluated.

Additional tests. Abdominal ultrasound was performed and urine specific gravity was measured in case of azotaemia.

Treatment

Dogs ($n = 25$) that fulfilled the enrolment criteria were randomized by means of a computer-generated schedule into a probiotic group (PRO; $n = 13$) and a placebo group (PLAC; $n = 12$). Patients in PLAC received an orally administered placebo powder (maltose with trace amounts of silicon dioxide) packed in sachets and patients in PRO received a high potency, multi strain, orally administered probiotic powder every 24 hours for 21 days packed in sachets containing 450 billion cfu each. The placebo or probiotic powder was given orally either over food in dogs with appetite or diluted in water administered with a 5 mL syringe in anorectic patients. The probiotic mixture contained the following live bacterial strains: *Lactobacillus plantarum* DSM 24730, *Streptococcus thermophilus* DSM 24731, *Bifidobacterium breve* DSM 24732, *Lactobacillus paracasei* DSM 24733, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 24734, *Lactobacillus acidophilus* DSM 24735, *Bifidobacterium longum* 120 DSM 24736, and *Bifidobacterium infantis* DSM 24737 in the specific combination which is currently sold under the brand Vivomixx in Continental Europe and Visbiome in the USA and Canada. According to the manufacturer, each strain in the probiotic blend was individually cultured and then filtered to separate the bacteria from the culture medium. The concentrated culture was then lyophilized for each strain separately. The finished product was shipped to the clinic and stored under refrigerated conditions to ensure product potency ($4-8^{\circ}\text{C}$). Dosing was based on body weight: 225 billion colony forming units (cfu) for 1–10 kg dogs; 450 billion cfu for 10–20 kg dogs; 900 billion cfu for 20–40 kg dogs for 21 days on a daily basis.

Additional therapy during hospitalization was standardized and equal for both groups. It consisted of fluid therapy (crystalloids; amount depended on dehydration, maintenance demands, and ongoing losses) and antiemetics (maropitant 1 mg/kg SC q24 h; Cerenia, Pfizer Pharma GmbH) in case of vomiting. Analgetics were administered if required (buprenorphine 0.01 mg/kg intravenous every 6 hours or every 8 hours; Vetergesic Multidose, Patheon UK, Swindon, UK). A gastrointestinal diet (Royal Canin, Gastro Intestinal) was fed during hospitalization and owners were instructed to continue the diet until day 21 at home.

Evaluation of clinical signs

Day 0 was defined as the day of clinical presentation and study inclusion. For eight days, clinical signs were assessed and quantified by a clinician during hospitalization or the owner at home using the canine hemorrhagic diarrhea severity index (CHDSI, Table 1). The CHDSI includes the parameters activity, appetite, vomiting (times/day), fecal consistency, defecation (times/day), and admixture of blood in the stool. Each parameter was scored from 0 to 3, and the sum of scores yielded a total cumulative score. On days with no bowel movement, the fecal consistency and defecation (times/day) were scored as zero. Clinicians as well as owners were blinded to the treatment. Only dogs showing normal activity and appetite, no vomiting, no dehydration, and no watery diarrhea (only dogs with normal, slightly soft or very soft fecal consistency; equivalent to a score of 0–2 according to the CHDSI) were discharged from the hospital.

Analysis of fecal microbiota

Fecal samples collected on day 0, day 7, and day 21 were used for analysis of the fecal microbiota. Fecal DNA was extracted as described previously [13]. Briefly, an aliquot of 100 mg (wet

Table 1. Criteria for assessment of the CHDS index (canine hemorrhagic diarrhea severity-index).

Parameter	0	1	2	3
Activity	Normal	Mildly reduced	Moderately reduced	Severely reduced
Appetite	Normal	Mildly reduced	Moderately reduced	Severely reduced
Vomiting	0	1x/day	2-3x/day	>3/day
Fecal consistency	Normal	Slightly soft	Very soft	Watery
Defecation	1x/day	2-3x/day	4-5x/day	>5/day
Blood admixtures	No	Mild	Moderate	Predominantly

Total score: 0–3: clinically insignificant; 4–5: mild; 6–8: moderate; >9: severe AHDS

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204691.t001>

weight) of each fecal sample was extracted by a bead-beating method using a MoBio Power soil DNA isolation kit (MoBio Laboratories, USA) following the manufacturer's instructions. Quantitative PCR assays (qPCR) for key bacterial taxa that are altered in dogs with gastrointestinal disease (i.e., total bacteria, *Faecalibacterium*, *Turicibacter*, *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Blautia*, *Fusobacterium* and *Clostridium hiranonis*) were performed as previously described [13, 24]. PCR was also used to quantify the abundance of *C. perfringens* and the abundance of the genes encoding enterotoxin as described previously [2]. For quantification of genes encoding *netF*, primers were used as described previously [4]. The oligonucleotide sequences of primers and probes, and respective annealing temperatures are summarized in S1 Table. PCR conditions were 95°C for 20 seconds, 40 cycles at 95°C for 5 seconds, and 10 seconds at the optimized annealing temperature. For probe based assays, the mastermix consisted of 10 µL of TaqMan reaction mixtures containing 5 µL of TaqMan Fast Universal PCR master mix (2×), No AmpErase UNG (Applied Biosystems), 1 µL of water, 0.4 µL of each primer (final concentration: 400 nM), 0.2 µL of the probe (final concentration: 200 nM), 1 µL of 1% bovine serum albumin (BSA, final concentration: 0.1%), and 2 µL of DNA (1: 10 or 1: 100 dilution). For SYBR based assays PCR conditions were 95°C for 2 minutes, and 40 cycles at 95°C 5 seconds and 10 seconds at the optimized annealing temperature (S1 Table) with 10 µL of SYBR-based reaction mixtures containing 5 µL of SsoFast EvaGreen supermix (Biorad Laboratories), 1.6 µL of water, 0.4 µL of each primer (final concentration: 400 nM), 1 µL of 1% BSA (final concentration: 0.1%), and 2 µL of DNA (1:10 or 1:100 dilution). The qPCR results were expressed as the log amount of DNA (fg) for each bacterial group/10 ng of isolated total DNA. The results of the qPCR assays were statistically analyzed for individual taxa as well as expressed as single numerical value, the Dysbiosis Index (DI). A negative DI indicates normobiosis, whereas a positive DI indicates dysbiosis [13].

Statistical analysis

The data for the qPCR assays, the CHDSI and signalment (age, gender, weight, breed) were tested for normal distribution using D'Agostino & Pearson omnibus normality tests. Group comparisons of data for the qPCR assays were performed using either an unpaired t-test or Mann-Whitney tests as appropriate. Comparisons within a group between time points were performed using either a paired t-test or Wilcoxon matched-pairs signed rank test as appropriate. Friedman test and Dunn's multiple comparison test were used for comparison of CHDSI between time points among groups. Chi-square test was used for comparing proportions of dogs positive for *netF* toxin gene and enterotoxin gene. Significance was set at $p < 0.05$. All statistics were performed in GraphPad Prism 7.0c (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

Results

Animals

Of the 84 dogs presented with hemorrhagic diarrhea during the study period, 59 patients were excluded from the study, due to various reasons (Fig 1). Seven of 84 dogs (8.3%) were excluded because they were pre-treated with antibiotics at time of presentation. Twenty-three (27.4%) were excluded because they were treated with antibiotics during hospitalization due to either signs of sepsis ($n = 15/84$; 17.9%), cystitis ($n = 2/84$; 2.4%), colitis ($1/84$; 1.2%), or unknown reasons ($n = 5/84$; 6.0%). Twenty dogs (23.8%) needed to be excluded because of compliance issues with owners (i.e., dogs would have fulfilled the inclusion criteria but owners were not willing to participate in the study initially or did not comply fecal sample collection during the study). Five dogs (6.0%) were tested positive for various parasites (e.g. *Toxocara canis*, *Giardia*, *Cryptosporidia*), two dogs (2.4%) had a positive PCR result for parvovirus, one dog (1.2%) was diagnosed with pancreatitis, and in one dog (1.2%) sudden death occurred during initial examination.

Twenty-five of 84 dogs (29.8%) were diagnosed with acute hemorrhagic diarrhea syndrome and eligible to enter the study. They were randomly divided into two groups, PRO ($n = 13$) and PLAC ($n = 12$) by means of a computer-generated schedule. The mean (SD) age in PRO was 6.0 years (3.9) while it was 5.5 years (3.9) in PLAC. No significant differences in age ($p = 0.748$), gender ($p = 0.561$), body weight ($p = 0.397$) or breed distribution ($p = 0.390$) were found between the two groups.

CHDS index (CHDSI)

On day 0, mean (SD) CHDSI in PRO was 13 (3.2) and in PLAC it was 13 (3.4), which was not significantly different between groups ($p = 0.980$) (Fig 2). Compared to day 0, there was a significantly lower CHDSI observed on day 3 ($p = 0.008$) in PRO with mean CHDSI of 5.0 (3.0). In PLAC there was a significant lower CHDSI observed on day 4 ($p = 0.002$) compared to day 0 with mean CHDSI of 5.2 (2.8). After day 6, the mean CHDSI stayed below 3 in both groups, indicating clinically insignificant signs according to the CHDSI. There were no further significant differences observed between PRO and PLAC on any study day.

Fecal microbiota

On day 0, the abundances of *Faecalibacterium*, *Turicibacter*, *E. coli*, *Streptococcus*, *Blautia*, *Fusobacterium*, and *C. hiranonis* were not significantly different between PRO and PLAC (Table 2; Fig 3). In PRO the abundances of *Blautia* ($p < 0.001$), *C. hiranonis* ($p = 0.001$), *Streptococcus* ($p = 0.001$), *Faecalibacterium* ($p = 0.035$) and *Turicibacter* ($p = 0.037$) were significantly higher on day 7 compared to day 0. In contrast, in PLAC there was a significantly higher abundance of *Blautia* ($p = 0.016$), *C. hiranonis* ($p = 0.014$) and *Turicibacter* ($p = 0.008$) only seen on day 21 compared to day 0. There was no significantly higher abundance of *Streptococcus* and *Faecalibacterium* in PLAC on any study day compared to day 0. Additionally, dogs in PRO had a significantly higher abundance of *C. hiranonis* ($p = 0.014$), *Streptococcus* ($p = 0.013$) and *Faecalibacterium* ($p = 0.018$) compared to PLAC on day 7. No significant changes over time within groups or between groups were observed for *E. coli* and *Fusobacterium* (Table 2). The baseline dysbiosis index (DI) was not significantly different ($p = 0.567$) between PRO and PLAC (Fig 3). On day 0, 4/13 dogs (31%) in PRO and 4/10 dogs (40%) in PLAC had a DI above 0. The DI showed a decreasing tendency with 3/13 dogs (23%) in PRO, 3/12 dogs (25%) in PLAC having a DI above 0 on day 7. After day 7, only one dog in PLAC had a DI above 0 on

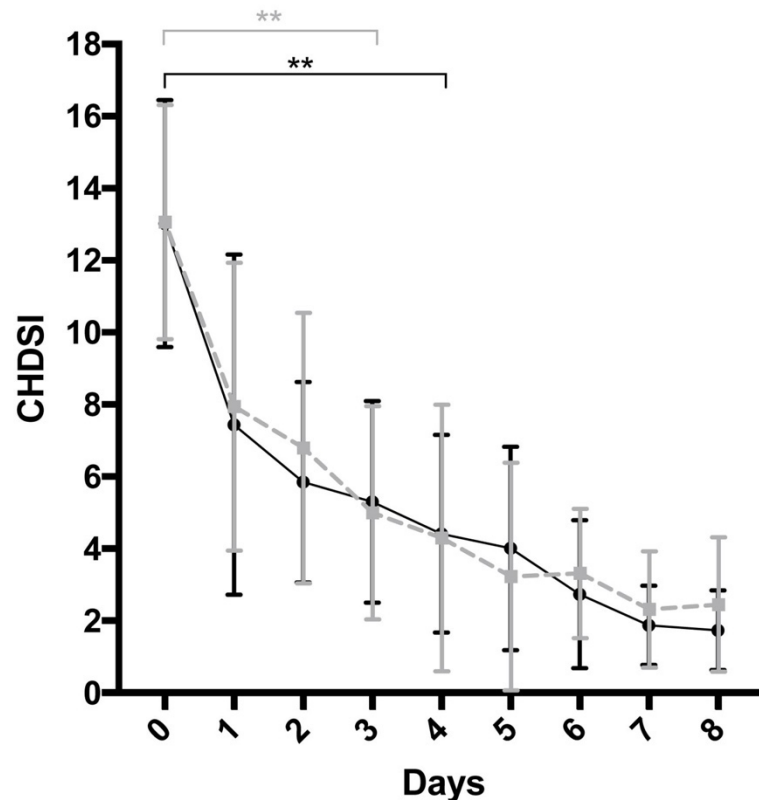


Fig 2. Assessment of clinical signs with the canine hemorrhagic diarrhea severity index (CHDSI). Index includes the parameters activity, appetite, vomiting (times/day), stool consistency, defecation (times/day) and admixture of blood in the stool. Each parameter is scored from 0 to 3, and the sum of scores yielded a total cumulative score. PRO = probiotic group (grey, dashed); PLAC = placebo group (black). Error bars show mean + standard deviation. In PRO the first day with a significantly lower CHDSI compared to day 0 was day 3 ($p = 0.008$) while in PLAC the first day with a significantly lower CHDSI compared to day 0 was day 4 ($p = 0.002$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204691.g002>

Table 2. Abundance of bacterial groups in dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome.

	PRO			PLAC		
	Day 0	Day 7	Day 21	Day 0	Day 7	Day 21
<i>E. coli</i>	5.91 (1.70) ^a	5.30 (1.54) ^a	5.49 (1.18) ^a	6.60 (1.46) ^a	5.80 (1.86) ^a	5.43 (1.70) ^a
<i>Faecalibacterium</i>	5.85 (1.25) ^a	6.68 (0.70) ^b	7.02 (0.50) ^b	5.82 (0.97) ^a	5.38 (1.68) ^a	6.56 (1.02) ^a
<i>Turicibacter</i>	4.39 (0.64) ^a	5.28 (1.33) ^b	5.84 (1.27) ^b	4.26 (1.18) ^a	5.64 (1.56) ^{ab}	5.75 (1.39) ^b
<i>Streptococcus</i>	4.96 (1.33) ^a	7.15 (0.75) ^b	6.42 (1.31) ^{ab}	4.61 (0.90) ^a	5.39 (1.65) ^a	6.01 (1.95) ^a
<i>Blautia</i>	7.82 (0.99) ^a	9.57 (0.33) ^b	9.60 (0.37) ^b	7.82 (0.84) ^a	8.35 (1.15) ^{ab}	9.24 (0.36) ^b
<i>Fusobacterium</i>	9.08 (1.08) ^a	8.81 (0.84) ^a	9.00 (0.62) ^a	8.73 (1.09) ^a	9.41 (1.04) ^a	9.34 (0.78) ^a
<i>C. hiranonis</i>	4.53 (1.52) ^a	6.08 (0.24) ^b	6.01 (0.16) ^b	3.68 (1.83) ^a	4.27 (2.46) ^{ab}	6.13 (0.30) ^b
<i>C. perfringens</i>	6.98 (1.17) ^a	5.80 (1.15) ^b	4.79 (1.41) ^b	6.52 (1.37) ^a	5.17 (2.40) ^a	5.97 (1.45) ^a

PRO = probiotic group; PLAC = placebo group; values represent mean (SD) log DNA/g feces.

Columns within groups not sharing a common superscript are significantly different from each other ($p < 0.05$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204691.t002>

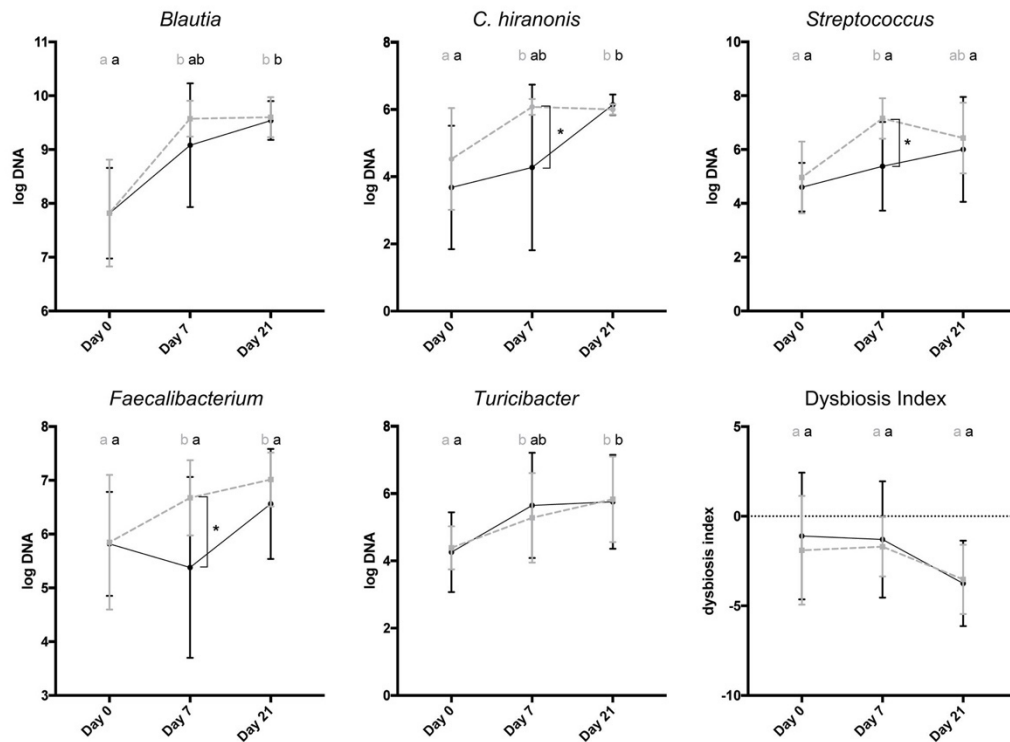


Fig 3. Abundance of *Blautia*, *C. hiranonis*, *Streptococcus*, *Faecalibacterium*, *Turicibacter* and dysbiosis index. PRO = probiotic group (grey, dashed); PLAC = placebo group (black). A negative DI indicates normobiosis, whereas a positive DI indicates dysbiosis. Error bars show mean + standard deviation. Days not sharing a common superscript are significantly different from each other ($p < 0.05$). Asterisk indicates significant difference ($p < 0.05$) between groups.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204691.g003>

day 21, and there was no significant difference between PRO and PLAC or between time points among groups.

C. perfringens

All dogs were positive for *C. perfringens* on all days. On day 0, the abundance of *C. perfringens* was not significantly different ($p = 0.376$) between PRO and PLAC (Fig 4). The abundance of *C. perfringens* was significantly lower on day 7 ($p = 0.011$) compared to baseline in PRO. In contrast, in PLAC *C. perfringens* were not significantly lower on any study day compared to baseline.

C. perfringens strains encoding enterotoxin

On day 0, the abundance ($p = 0.842$) as well as the number of dogs positive for enterotoxin genes (10/13 positive in PRO vs. 7/10 in PLAC; $p = 0.708$) were not significantly different between PRO and PLAC (Fig 4). On day 7, the abundance of enterotoxin genes was significantly lower compared to baseline in both PRO ($p = 0.016$) and PLAC ($p = 0.016$) and also

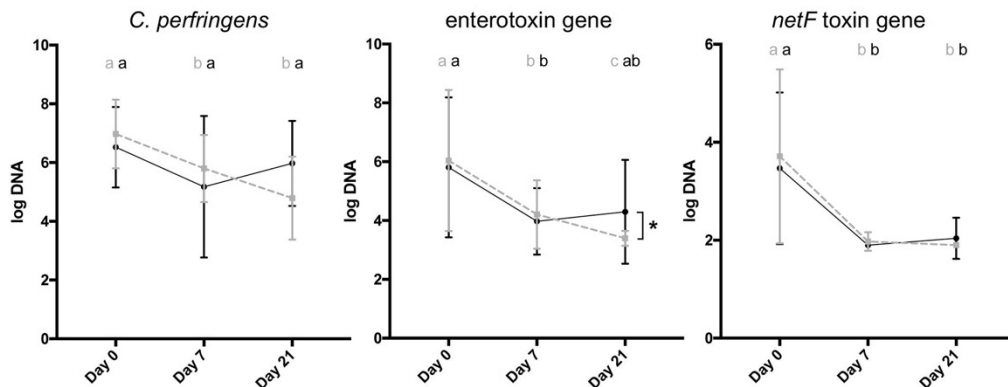


Fig 4. Abundance of *C. perfringens*, *C. perfringens* encoding enterotoxin and *NetF* toxin. PRO = probiotic group (grey, dashed); PLAC = placebo group (black). Error bars indicate mean + standard deviation. Days not sharing a common superscript are significantly different from each other ($p < 0.05$). Asterisk indicates significant difference ($p < 0.05$) between groups.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204691.g004>

number of dogs positive for enterotoxin genes was not significantly different between groups (7/13 positive in PRO vs. 6/12 in PLAC; $p = 0.695$). On day 21, the abundance of enterotoxin genes was significantly lower in PRO compared to PLAC ($p = 0.028$). Proportions of dogs positive for enterotoxin encoding *C. perfringens* strains were also significantly lower in dogs receiving probiotic on day 21 (1/10 positive in PRO vs. 5/8 in PLAC; $p = 0.019$).

C. perfringens strains encoding *NetF* toxin (*netF*)

On day 0, a total of 13/23 (57%) dogs were positive for *netF* and there was no significant difference in number of dogs positive for *netF* between groups (7/13 positive in PRO vs. 6/10 positive in PLAC, $p = 0.768$). Additionally, the baseline abundance of *netF* was not significantly different ($p = 0.764$) between PRO and PLAC (Fig 4). The abundance of *netF* was significantly lower on day 7 compared to baseline in both PRO ($p = 0.016$) and PLAC ($p = 0.031$). After day 7 all dogs except one in PLAC on day 21, were below the detection limit of the PCR assay for *netF*. There was no significant difference in abundance or number of dogs positive for *netF* between groups on any study day.

Discussion

The aim of this study was to evaluate whether probiotic treatment has an impact on the clinical course, the intestinal microbiome and the abundance of *C. perfringens* and toxigenic *C. perfringens* in dogs with AHDS. Therefore, dogs with hemorrhagic diarrhea lasting less than three days were included in this trial. Dogs with an underlying disease possibly responsible for hemorrhagic diarrhea or dogs with potential signs of sepsis at clinical presentation or during the study were excluded. Dogs in the probiotic group received a high potency, multi strain, orally administered probiotic powder, which was chosen based on previous studies demonstrating upregulated expression of tight junction proteins and clinical response in dogs with IBD [21, 22].

Acute hemorrhagic diarrhea syndrome is characterized by its self-limiting rapid course and has a good short-term prognosis when treated symptomatically [7, 25]. We observed that all dogs that fulfilled the inclusion criteria indeed showed a rapid clinical improvement within a

few days. Based on the CHDSI, dogs in both groups were considered to have mild signs already after 4 days and both groups had clinically insignificant signs after only 6 days (mean CHDSI below 3). These results correspond to the findings in previous studies [7, 25]. We observed that a significant recovery in PRO was already seen on day 3, while in PLAC it was seen on day 4 compared to baseline. No further differences in severity or duration of clinical signs between PRO and PLAC were seen. Since dogs with aseptic AHDS usually show a rapid clinical improvement, more significant differences in clinical signs between treatment groups might have been difficult to detect even if they were documented on a daily basis as performed in this study.

Many practitioners still administer antibiotics to dogs with acute hemorrhagic diarrhea even if patients do not show any signs of sepsis. In our study, 15 of the 84 dogs (17.9%) with acute hemorrhagic diarrhea were not included in the study since they showed signs that potentially reflect sepsis. A definitive diagnosis of sepsis in dogs with AHDS is difficult, since there is a significant overlap concerning criteria for sepsis and hypovolemia. Individual dogs with AHDS are still at risk to develop sepsis, likely due to bacterial translocation because of a damaged intestinal barrier. Of particular interest is the fact that the dogs in our study that had no signs of sepsis showed a rapid improvement under symptomatic therapy, and all dogs returned to a normal stool consistency and frequency within a few days without antibiotic treatment. This emphasizes the findings of previous studies, which showed that antibiotic therapy yields no advantages compared to symptomatic therapy in dogs with acute diarrhea as long as the patients do not show signs of sepsis [6, 7]. This is even more of interest, since bacterial resistances are an increasing problem in public health care and unnecessary use of antibiotics should be avoided [26, 27].

The intestinal tract of healthy dogs is inhabited by a diverse intestinal microbiota with *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, and *Fusobacteria* being the predominant bacterial phyla. The intestinal microbiota plays an important role in host health by contributing to many different pathways, such as producing metabolites like short chain fatty acids or by participating in bile acid conversion [28–31]. Moreover, a crosstalk between gut microbiota and host immune cells exists, enabled by microbial-derived metabolites and bacterial surface molecules [32]. It has been shown that dogs with acute hemorrhagic diarrhea have alterations in their intestinal microbiome. Bacterial taxa most commonly altered include increases in *C. perfringens* and *E. coli*, and decreases in *Blautia*, *Turicibacter*, *Faecalibacterium*, and *Streptococcus* spp. compared to healthy dogs [11, 12, 33]. Recently, a quantitative PCR-based dysbiosis index (DI) was developed to quantify these specific bacterial groups and combine them numerically into one single number to assess fecal dysbiosis in canine fecal samples [13]. A negative DI indicates normobiosis, whereas a positive DI indicates dysbiosis. On day 0, 31% of dogs in PRO and 40% of dogs in PLAC had a DI above zero, indicating intestinal dysbiosis. Overall, the DI showed a similar tendency to decrease in both groups reflecting normalization of the intestinal microbiota. Within 21 days, all dogs except one dog in PLAC returned to a negative DI indicating intestinal normobiosis. These findings suggest that AHDS is a self-limiting syndrome not only regarding clinical signs but also regarding the intestinal microbiome.

Species belonging to the genus *Blautia* are involved in glucose metabolism, producing metabolites like acetate, ethanol, hydrogen, lactate and succinate [34], and *Blautia* represent about 8.9–25.2% (median 14.0%) of the intestinal bacteria [12]. Studies in humans have shown that a decreased abundance of *Blautia* is accompanied with negative effects on host health, such as negative prognostic factors in early-stage breast cancer or higher graft-versus-host disease related mortality [35, 36]. *C. hiranonis* is considered to be a beneficial bacterium that plays a role in bile acid conversion [28] while *Turicibacter* is likely to play a role in the metabolism of butyric acid [37]. *Faecalibacterium* was shown to have anti-inflammatory properties

and human inflammatory bowel disease and infectious colitis were associated with low counts of *Faecalibacterium* [38, 39]. *Blautia* have a mean abundance of 9.7 log DNA, *C. hiranonis* a mean abundance of 6.4 log DNA, *Faecalibacterium* a mean abundance of 6.2 log DNA and *Turicibacter* a mean abundance of 6.1 log DNA per gram of feces as described in 95 healthy dogs using the same PCR techniques [13]. In veterinary medicine, previous studies observed a significant decrease in *Blautia*, *Faecalibacterium* and *Turicibacter* in dogs with acute hemorrhagic and non-hemorrhagic diarrhea [3, 11, 12]. Consistent to those previous findings, in our study we observed a reduced mean abundance of *Blautia*, *Faecalibacterium* and *Turicibacter* (Table 2) on day 0 according to the reference intervals set by AlShawaqfeh et al. In dogs treated with the probiotic we observed a higher abundance of *Blautia*, *Faecalibacterium*, *Turicibacter*, *C. hiranonis* and *Streptococcus* on day 7 compared to baseline while in dogs treated with placebo a higher abundance was only seen on day 21 or on no study day at all (Fig 3).

C. perfringens is a commensal of the intestinal tract and can be found in up to 76% in the feces of healthy non-diarrheic dogs [2, 40, 41]. It has been shown that dogs with acute hemorrhagic and non-hemorrhagic diarrhea have a significantly higher abundance of *C. perfringens* [2], while dogs with IBD do not have a significantly higher abundance compared to healthy dogs [11]. Moreover, the abundance of *C. perfringens* encoding enterotoxin and the prevalence of dogs positive for enterotoxin itself via ELISA toxin immunoassay are significantly higher in dogs with acute diarrhea than in healthy dogs [2]. However, *C. perfringens* enterotoxin is unlikely to be the primary cause of AHDS, since there was no difference found in severity of clinical signs, duration of hospitalization or laboratory parameters between dogs positive or negative for *C. perfringens* encoding enterotoxin based on PCR assays [3]. Additionally, there was no difference seen in dogs being positive or negative for enterotoxin itself based on ELISA toxin immunoassay data [3]. In this study, we detected a significantly lower abundance of *C. perfringens* in PRO compared to baseline on day 7, whereas there was no significant lower abundance in PLAC on any day compared to day 0. Proportions of dogs positive as well as the abundance of *C. perfringens* encoding enterotoxin were significantly lower in dogs receiving probiotic on day 21 in comparison to dogs that received placebo. These findings suggest that probiotic treatment in this study was associated with an increase of beneficial bacteria such as *Blautia*, *C. hiranonis*, *Streptococcus*, *Faecalibacterium* and *Turicibacter* and an accelerated decrease of possible pathogenic bacteria like *C. perfringens*. We did not examine the exact mechanisms of how the probiotic mixture affected the intestinal microbiota in this study. Probiotic bacterial strains can modulate the immune system and enhance intestinal barrier function through different mechanisms of action. Studies reported a response of the gut associated lymphoid tissue (GALT) following the administration of *L. plantarum* and *L. acidophilus* [42, 43]. Also antibody production such as IgA from plasma cells, which protect the host by binding several antigens were observed following treatment with *B. lactis* strains [44]. Moreover, previous studies observed that Lactobacillus strains (*L. acidophilus* and *L. fermentum*) are able to inhibit the growth of *C. perfringens* in vitro. This inhibition was not only caused by lowering the pH level, as *C. perfringens* is a pH sensitive bacterium, but also likely due to bacteriocin production by *L. acidophilus* and *L. fermentum* [45, 46]. The probiotic mixture used in our study may be associated with an increase of beneficial bacteria and decrease of possible pathogenic bacteria due to similar mechanisms. The formula of the probiotic used in our study contains a higher concentration of bacteria compared to several other probiotic products, which may have promoted this effect. Further research is warranted to elucidate the mechanisms of action of probiotics in dogs with AHDS.

The novel pore-forming cytotoxic toxin *NetF* was recently isolated from a dog with acute hemorrhagic diarrhea [4]. The study observed a highly significant association between the presence of *C. perfringens* encoding *NetF* toxin and canine hemorrhagic diarrhea compared to

undifferentiated enteritis and 75% of the isolates from hemorrhagic diarrhea were positive for *netF* [4]. In our study, we observed that 57% of all dogs that fulfilled the inclusion criteria were positive for *netF* at time of clinical presentation. *NetF* decreased rapidly, and after day 7 all dogs, except one dog in PLAC on day 21, were below the detection limit of the PCR assay. Since both groups showed a rapid decrease, it is likely that the *NetF* toxemia in dogs with hemorrhagic diarrhea is self-limiting and parallels clinical improvement.

A limitation of this study is the small sample size of 25 dogs. Future studies with a higher sample size could provide more detailed data regarding the changes in microbiome and may also be able to detect more significant differences in the clinical course. Additionally, a more frequent analysis of fecal samples, especially in the first days after clinical presentation, could have offered a more precise insight on the course of the intestinal microbiome in dogs with AHDS treated with the probiotic. A possible limitation also may be that we did not perform a whole screening of the intestinal microbiome. Reasons for not performing a sequencing-based approach was that we employed reproducible qPCR assays that targeted those bacterial groups previously found to be altered in canine gastrointestinal disease, including AHDS. Additionally, we also did not perform a toxin immunoassay for *C. perfringens* enterotoxin, as the commercially available immunoassay has not been validated for use in dogs. To our knowledge, no immunoassay is available for measurement of *NetF* toxin.

In conclusion, the results of this study show that aseptic AHDS is characterized by its rapid self-limiting course regarding clinical signs and the presence of *netF* toxin genes. Both groups recovered quickly with a significant improvement on day 3 in the probiotic group and day 4 in placebo group compared to day of clinical presentation. Dogs receiving probiotic treatment also showed an accelerated normalization of *Blautia*, *C. hiranonis*, *Faecalibacterium*, and *Turicibacter* compared to dogs that were only treated symptomatically. Additionally, the abundance of *C. perfringens* encoding enterotoxin was significantly lower in dogs receiving probiotics.

Supporting information

S1 Table. Oligonucleotides primers/probes used in this study.
(DOCX)

Acknowledgments

Preliminary results were presented at the 26th Annual Conference of Internal Medicine and Clinical Pathology, Hannover, 2nd-3rd February 2018. The probiotic (trade name Vivomixx) was provided by the company MENDES S.A. (Via Giacometti, 1, 6900 Lugano Switzerland).

ALZ received travel support from MENDES S.A. to travel to an international conference. JSS has received consulting fees from ExeGi Pharma. Jan Suchodolski is an editor of PLOS ONE.

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sector. We sincerely thank Dr. Gabriela Princess of Leiningen and Renate Thyssen-Henne for their generous donation to the Clinic of Small Animal Internal Medicine of the LMU University of Munich, Germany.

Author Contributions

Conceptualization: Stefan Unterer.

Data curation: Anna-Lena Ziese, Alexandra Anderson, Fatima Sarwar, Natalie Sindern.

Formal analysis: Anna-Lena Ziese, Jan S. Suchodolski.

Investigation: Anna-Lena Ziese, Kathrin Busch, Alexandra Anderson, Natalie Sindern.

Methodology: Kathrin Busch.

Project administration: Jan S. Suchodolski, Stefan Unterer.

Resources: Jan S. Suchodolski.

Supervision: Kathrin Busch, Stefan Unterer.

Validation: Jan S. Suchodolski.

Visualization: Anna-Lena Ziese.

Writing – original draft: Anna-Lena Ziese.

Writing – review & editing: Anna-Lena Ziese, Jan S. Suchodolski, Katrin Hartmann, Kathrin Busch, Stefan Unterer.

References

1. Unterer S, Busch K, Leipzig M, Hermanns W, Wolf G, Straubinger RK, et al. Endoscopically visualized lesions, histologic findings, and bacterial invasion in the gastrointestinal mucosa of dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome. *J Vet Intern Med.* 2014; 28(1):52–8. <https://doi.org/10.1111/jvim.12236> PMID: 24205886.
2. Minamoto Y, Dhanani N, Markel ME, Steiner JM, Suchodolski JS. Prevalence of *Clostridium perfringens*, *Clostridium perfringens* enterotoxin and dysbiosis in fecal samples of dogs with diarrhea. *Veterinary microbiol.* 2014; 174(3–4):463–73. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.10.005> PMID: 25458422.
3. Busch K, Suchodolski JS, Kuhnner KA, Minamoto Y, Steiner JM, Mueller RS, et al. *Clostridium perfringens* enterotoxin and *Clostridium difficile* toxin A/B do not play a role in acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dogs. *Vet Rec.* 2015; 176(10):253. <https://doi.org/10.1136/vr.102738> PMID: 25467148.
4. Gohari IM, Parreira VR, Nowell VJ, Nicholson VM, Oliphant K, Prescott JF. A novel pore-forming toxin in type A *Clostridium perfringens* is associated with both fatal canine hemorrhagic gastroenteritis and fatal foal necrotizing enterocolitis. *PLoS One.* 2015; 10(4):e0122684. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122684> PMID: 25853427.
5. Busch K, Sindern N, Hartmann K, Leutenegger C, Prescott JF, Proksch L, et al., editors. The role of pore-forming toxins in dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome. ACVIM Forum; National Harbor, Maryland: J Vet Intern Med. 2017; 31:1225–1361.
6. Israiloff J. Vergleich von Therapieformen der idiopathischen hämorrhagischen Gastroenteritis (HGE) beim Hund. Inaugural-Dissertation. Veterinärmedizinischen Universität Wien 2009. https://vetdoc.vu-wien.ac.at/vetdoc/suche/publikationen_mug_autoren?sprache_in=de&menue_id_in=206&id_in=176&publikation_id_in=65725
7. Unterer S, Strohmeier K, Kruse BD, Sauter-Louis C, Hartmann K. Treatment of aseptic dogs with hemorrhagic gastroenteritis with amoxicillin/clavulanic acid: a prospective blinded study. *J Vet Intern Med.* 2011; 25(5):973–9. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.00765.x> PMID: 21781168.
8. Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol.* 2008; 6(11):e280. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060280> PMID: 19018661.
9. Torres-Henderson C, S. S, Suchodolski J, Lappin MR. Effect of *Enterococcus faecium* Strain SF68 on gastrointestinal signs and fecal microbiome in cats administered amoxicillin-clavulanate. *Topics in Companion Animal Medicine.* 2017; 32(3):104–8. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2017.11.002> PMID: 29291771.
10. Costelloe C, Metcalfe C, Lovering A, Mant D, Hay AD. Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2010; 340: c2096. <https://doi.org/10.1136/bmj.c2096> PMID: 20483949.
11. Suchodolski JS, Markel ME, Garcia-Mazcorro JF, Unterer S, Heilmann RM, Dowd SE, et al. The fecal microbiome in dogs with acute diarrhea and idiopathic inflammatory bowel disease. *PLoS One.* 2012; 7(12):e51907. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051907> PMID: 23300577.

12. Guard BC, Barr JW, Reddivari L, Klemashevich C, Jayaraman A, Steiner JM, et al. Characterization of microbial dysbiosis and metabolomic changes in dogs with acute diarrhea. *PLoS One*. 2015; 10(5): e0127259. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127259> PMID: 26000959.
13. AlShawaqfeh MK, Wajid B, Minamoto Y, Markel M, Lidbury JA, Steiner JM, et al. A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy. *FEMS Microbiol Ecol*. 2017; 93(11). <https://doi.org/10.1093/femsec/fix136> PMID: 29040443.
14. Gavazza A, Rossi G, Lubas G, Cerquetella M, Minamoto Y, Suchodolski JS. Faecal microbiota in dogs with multicentric lymphoma. *Vet Comp Oncol*. 2018; 16(1):E169–E75. <https://doi.org/10.1111/vco.12367> PMID: 29152844.
15. Grzeskowiak L, Endo A, Beasley S, Salminen S. Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. *Anaerobe*. 2015; 34:14–23. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.002> PMID: 25863311.
16. Schmitz S, Suchodolski JS. Understanding the canine intestinal microbiota and its modification by pro-, pre- and synbiotics—what is the evidence? *Vet Med Sci*. 2016; 2(2):71–94. <https://doi.org/10.1002/vms3.17> PMID: 29067182.
17. Kelley R, Kerinne L, Mundell P, Hayek M. Effects of varying doses of a probiotic supplement fed to healthy dogs undergoing kenneling stress. *Intern J Appl Res Vet Med*. 2012; 10(3):205–16.
18. Kelley RL, Minikhiem D, Kiely B, O'Mahony L, O'Sullivan D, Boileau T, et al. Clinical benefits of probiotic canine-derived *Bifidobacterium animalis* strain AHC7 in dogs with acute idiopathic diarrhea. *Vet Ther*. 2009; 10(3):121–30. PMID: 20037966.
19. Herstad HK, Nesheim BB, L'Abee-Lund T, Larsen S, Skancke E. Effects of a probiotic intervention in acute canine gastroenteritis—a controlled clinical trial. *J Small Anim Pract*. 2010; 51(1):34–8. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2009.00853.x> PMID: 20137007.
20. Rose L, Rose J, Gosling S, Holmes M. Efficacy of a probiotic-prebiotic supplement on incidence of diarrhea in a dog shelter: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Vet Intern Med*. 2017; 31(2):377–82. <https://doi.org/10.1111/jvim.14666> PMID: 28186660.
21. Rossi G, Pengo G, Caldin M, Palumbo Piccionello A, Steiner JM, Cohen ND, et al. Comparison of microbiological, histological, and immunomodulatory parameters in response to treatment with either combination therapy with prednisone and metronidazole or probiotic VSL#3 strains in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *PloS One*. 2014; 9(4):e94699. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094699> PMID: 24722235.
22. White R, Atherly T, Guard B, Rossi G, Wang C, Mosher C, et al. Randomized, controlled trial evaluating the effect of multi-strain probiotic on the mucosal microbiota in canine idiopathic inflammatory bowel disease. *Gut Microbes*. 2017; 8(5):451–66. Epub 2017/07/06. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1334754> PMID: 28678609.
23. Arslan HH, Saripinar Aksu D, Terzi G, Nisbet C. Therapeutic effects of probiotic bacteria in parvoviral enteritis in dogs. *Rev Med Vet-Toulouse*. 2012; 2(163):55–9.
24. Garcia-Mazcorro JF, Suchodolski JS, Jones KR, Clark-Price SC, Dowd SE, Minamoto Y, et al. Effect of the proton pump inhibitor omeprazole on the gastrointestinal bacterial microbiota of healthy dogs. *FEMS Microbiol Ecol*. 2012; 80(3):624–36. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01331.x> PMID: 22324305.
25. Mortier F, Strohmeyer K, Hartmann K, Unterer S. Acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dogs: 108 cases. *Vet Rec*. 2015; 176(24):627. <https://doi.org/10.1136/vr.103090> PMID: 26023146.
26. Damborg P, Sorensen AH, Guardabassi L. Monitoring of antimicrobial resistance in healthy dogs: first report of canine ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* clonal complex 17. *Vet Microbiol*. 2008; 132(1–2):190–6. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.04.026> PMID: 18524501.
27. Carlet J. The gut is the epicentre of antibiotic resistance. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2012; 1(1):39. <https://doi.org/10.1186/2047-2994-1-39> PMID: 23181506.
28. Kitahara M, Takamine F, Imamura T, Benno Y. *Clostridium hiranonis* sp. nov., a human intestinal bacterium with bile acid 7 α -dehydroxylating activity. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001; 51(Pt 1):39–44. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-39> PMID: 11211270.
29. Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev*. 2001; 81(3):1031–64. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.1031> PMID: 11427691.
30. Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*. 2009; 136(1):65–80. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.10.080> PMID: 19026645.
31. Staley C, Weingarden AR, Khoruts A, Sadowsky MJ. Interaction of gut microbiota with bile acid metabolism and its influence on disease states. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017; 101(1):47–64. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8006-6> PMID: 27888332.

32. Bansal T, Alaniz RC, Wood TK, Jayaraman A. The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(1):228–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906112107> PMID: 19966295.
33. Markel M. Characterization of the Fecal Microbiota in Dogs with Chronic Enteropathies and Acute Hemorrhagic Diarrhea. M.Sc. Thesis, Texas A&M University. 2012. <https://pdfs.semanticscholar.org/dcf6/ab7f6ce55b523e4d1694f7dc5e98e8d7e22f.pdf>
34. Liu C, Finegold SM, Song Y, Lawson PA. Reclassification of *Clostridium coccoides*, *Ruminococcus hansenii*, *Ruminococcus hydrogenotrophicus*, *Ruminococcus luti*, *Ruminococcus productus* and *Ruminococcus schinkii* as *Blautia coccoides* gen. nov., comb. nov., *Blautia hansenii* comb. nov., *Blautia hydrogenotrophica* comb. nov., *Blautia luti* comb. nov., *Blautia producta* comb. nov., *Blautia schinkii* comb. nov. and description of *Blautia wexlerae* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008; 58(Pt 8):1896–902. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65208-0> PMID: 18676476.
35. Jenq RR, Taur Y, Devlin SM, Ponce DM, Goldberg JD, Ahr KF, et al. Intestinal *Blautia* Is Associated with Reduced Death from Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015; 21(8):1373–83. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2015.04.016> PMID: 25977230.
36. Luu TH, Michel C, Bard JM, Dravet F, Nazih H, Bobin-Dubigeon C. Intestinal proportion of *Blautia* sp. is associated with clinical stage and histoprosthetic grade in patients with early-stage breast cancer. *Nutr Cancer*. 2017; 69(2):267–75. <https://doi.org/10.1080/01635581.2017.1263750> PMID: 28094541.
37. Zhong Y, Nyman M, Fak F. Modulation of gut microbiota in rats fed high-fat diets by processing whole-grain barley to barley malt. *Mol Nutr Food Res*. 2015; 59(10):2066–76. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500187> PMID: 26184884.
38. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(43):16731–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105> PMID: 18936492.
39. Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, et al. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis*. 2009; 15(8):1183–9. <https://doi.org/10.1002/ibd.20903> PMID: 19235886.
40. Weese JS, Staempfli HR, Prescott JF, Kruth SA, Greenwood SJ, Weese HE. The roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in diarrhea in dogs. *J Vet Intern Med*. 2001; 15(4):374–8. PMID: 11467596.
41. Marks SL, Kather EJ, Kass PH, Melli AC. Genotypic and phenotypic characterization of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in diarrheic and healthy dogs. *J Vet Intern Med*. 2002; 16(5):533–40. PMID: 12322702.
42. Brisbin JT, Zhou H, Gong J, Sabour P, Akbari MR, Haghighi HR, et al. Gene expression profiling of chicken lymphoid cells after treatment with *Lactobacillus acidophilus* cellular components. *Dev Comp Immunol*. 2008; 32(5):563–74. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.09.003> PMID: 17981327.
43. Chang G, Shi Y, Le G, Xu Z, Sun J, Li J. Effects of *Lactobacillus plantarum* on genes expression pattern in mice jejunal Peyer's patches. *Cell Immunol*. 2009; 258(1):1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2009.02.005> PMID: 19398098.
44. Fukushima Y, Kawata Y, Hara H, Terada A, Mitsuoka T. Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *Int J Food Microbiol*. 1998; 42(1–2):39–44. PMID: 9706796.
45. Li J, McClane BA. Comparative effects of osmotic, sodium nitrite-induced, and pH-induced stress on growth and survival of *Clostridium perfringens* type A isolates carrying chromosomal or plasmid-borne enterotoxin genes. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72(12):7620–5. <https://doi.org/10.1128/AEM.01911-06> PMID: 17041163.
46. Guo S, Liu D, Zhang B, Li Z, Li Y, Ding B, et al. Two *Lactobacillus* species inhibit the growth and alpha-toxin production of *Clostridium perfringens* and induced proinflammatory factors in chicken intestinal epithelial cells *in vitro*. *Front Microbiol*. 2017; 8:2081. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02081> PMID: 29118744.

IV. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde der Einfluss eines Probiotikums auf den klinischen Verlauf, das fäkale Mikrobiom sowie die fäkale Menge an *C. perfringens* und toxinbildenden *C. perfringens* bei Hunden mit AHDS untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine randomisierte, geblindete, placebokontrollierte Therapiestudie durchgeführt, im Rahmen derer 25 Hunde mit AHDS ohne Zeichen einer systemischen Entzündung zusätzlich zu standardisierter symptomatischer Therapie über 21 Tage oral ein mehrstämmiges Probiotikum oder ein Placebo erhielten. Der klinische Verlauf wurde über acht Tage evaluiert. Vor Start der Therapie sowie am 7. und 21. Studientag wurde je eine Kotprobe zu Analyse Zwecken gesammelt. Im Kot wurden mittels qPCR die Mengen von *C. perfringens*, Enterotoxin-bildenden *C. perfringens* und NetF-Toxin-bildenden *C. perfringens* ermittelt sowie die gesamte Bakterienzahl und sieben bakterielle Taxa, die sich in vorherigen Studien bei Hunden mit gastrointestinalen Erkrankungen im Vergleich zu gesunden Hunden abweichend zeigten.

Das AHDS ist gekennzeichnet durch akut auftretenden blutigen Durchfall, dem in den meisten Fällen Erbrechen vorausgeht (MORTIER et al., 2015). Erkrankte Hunde zeigen häufig abdominale Schmerzen, Übelkeit und Anorexie (RÖDLER, 2016). Je nach Frequenz des Erbrechens sowie des Durchfalls und dem Ausmaß des daraus resultierenden Flüssigkeitsverlusts, zeigen Patienten Symptome einer Hypovolämie, wie z. B. vermindertes Allgemeinbefinden, Tachykardie, Tachypnoe und Hypothermie bis hin zum hypovolämischen Schock (BUSCH, 2013; MORTIER et al., 2015). Labordiagnostisch weisen erkrankte Tiere aufgrund der Dehydratation häufig eine Hämokonzentration und eine prärenale Azotämie auf. Zudem zeigen sie in vielen Fällen eine Leukozytose, eine Hypoproteinämie und Elektrolytverschiebungen (RÖDLER, 2016). Histopathologisch finden sich in der Mukosa des Dünn- und Dickdarms eine akute Nekrose sowie eine neutrophile Entzündung, während die Mukosa des Magens trotz klinisch sichtbarem Erbrechen keine Veränderungen zeigt (UNTERER et al., 2014). Da die Pathogenese des AHDS derzeit nicht vollständig geklärt ist, erfolgt eine Diagnosestellung unter Ausschluss möglicher weiterer Ursachen für akuten hämorrhagischen Durchfall (BUSCH, 2013),

Eine mögliche Komplikation des AHDS stellt eine bakterielle Translokation aus

dem Darm dar, die aufgrund einer intestinalen Überwucherung von Bakterien sowie der herabgesetzten Darmbarriere durch die intestinale Nekrose und Entzündung entstehen kann (WIEST und RATH, 2003). Es wird jedoch davon ausgegangen, dass der Großteil der an AHDS erkrankten Hunde dennoch in der Lage ist, Bakterien aus dem Blut zu eliminieren, so dass folglich nur wenige Tiere eine Sepsis entwickeln (UNTERER et al., 2015). Die genaue Prävalenz von Sepsisgeschehen bei AHDS ist derzeit nicht bekannt. Dies liegt unter anderem daran, dass sich Hypovolämie und Sepsis in ähnlichen klinischen Symptomen äußern können und somit Fehleinschätzungen bei klinischer Vorstellung möglich sind. UNTERER und Mitarbeiter (2015) untersuchten in einer Studie die Inzidenz einer Sepsis bei Hunden mit AHDS und verwendeten zu diesem Zweck Kriterien zur Feststellung einer systemischen Entzündungsreaktion (SIRS, Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom), die von HAUPTMAN und Mitarbeitern (1997), sowie DE LAFORCADE und Mitarbeitern (2003) charakterisiert wurden. Hierbei zeigte sich, dass 48 der 87 Studienteilnehmer (55 %) unter Anwendung dieser Kriterien eine SIRS aufwiesen. Von UNTERER und Mitarbeitern (2015) wurde somit geschlussfolgert, dass Symptome wie Hypothermie, Tachykardie und Tachypnoe nicht als Parameter zur Feststellung eines SIRS bei dehydrierten Patienten mit AHDS herangezogen werden sollten. In der vorliegenden Studie mussten 15 von 84 Tieren (17,9 %), die initial aufgrund von akutem blutigem Durchfall vorgestellt wurden und bei denen AHDS vermutet wurde, aus der Studie ausgeschlossen werden, da diese bei klinischer Vorstellung oder im Verlauf der Studie eindeutige Hinweise einer Sepsis zeigten. Da Patienten, die initial mit eindeutigen Sepsisanzeichen vorgestellt wurden, im Rahmen der vorliegenden Studie nicht weiterverfolgt wurden, ist es möglich, dass sich ebenfalls Tiere mit anderer zugrundeliegender Erkrankung als AHDS unter den ausgeschlossenen Tieren befanden. Es ist somit zu betonen, dass diese 17,9 % nicht die Prävalenz der Tiere mit AHDS, die eine Sepsis entwickelten, darstellt.

Therapeutisch steht bei AHDS der Ausgleich des durch Durchfall und Erbrechen entstehenden Flüssigkeitsverlustes mittels intravenöser Infusion kristalloider Lösungen im Mittelpunkt (UNTERER und HARTMANN, 2009). Aufgrund der unbekannten Pathogenese erfolgt die weitere Therapie symptomatisch in Form von Analgetika, Antiemetika und Antazida sowie einer magen-darm-schonenden Diät (RÖDLER, 2016). In der Regel zeigen Hunde mit AHDS unter symptomatischer

Therapie und ohne Antibiose eine schnelle klinische Besserung mit rapider Abnahme des Krankheitsaktivitätsindex innerhalb von zwei Tagen, und können nach einem medianen stationären Aufenthalt von drei (eins bis acht) Tagen nach Hause entlassen werden (MORTIER et al., 2015). Konsistent dazu zeigten auch die Hunde in der vorliegenden Studie eine schnelle klinische Besserung mit einem signifikant niedrigeren Krankheitsaktivitätsindex nach drei Tagen in der Probiotika-Gruppe und vier Tagen in der Placebo-Gruppe. Weiterhin befand sich der mittlere Krankheitsaktivitätsindex in beiden Gruppen nachdem 6. Studientag im klinisch insignifikanten Bereich. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie sprechen hinsichtlich des klinischen Verlaufs dafür, dass, konsistent zu vorherigen Studien, bei Hunden mit AHDS ohne Anzeichen einer Sepsis, mit einer rapiden klinischen Besserung zu rechnen ist. Weiterhin scheint in der vorliegenden Studie die probiotische Therapie mit einer beschleunigten klinischen Besserung assoziiert zu sein. Ein positiver Einfluss auf die klinische Symptomatik durch Probiotika wurde bei Hunden mit AHDS bisher nicht untersucht, konnte aber bereits bei Hunden mit anderen akuten gastrointestinalen Erkrankungen festgestellt werden. So zeigte sich bei Hunden mit akutem unkompliziertem Durchfall durch den Einsatz verschiedener Probiotika eine signifikant verkürzte Dauer des Durchfalls (KELLEY et al., 2009; HERSTAD et al., 2010). Der Einsatz des in der vorliegenden Studie verwendete Probiotikums war außerdem bei Welpen mit Parvovirose mit einer signifikant stärkeren Besserung des Krankheitsaktivitätsindex assoziiert (ARSLAN et al., 2012). Aufgrund der geringen Patientenzahl von 25 Tieren in der vorliegenden Studie ist die Aussagekraft des geringen Unterschiedes hinsichtlich des klinischen Verlaufs eingeschränkt. Insbesondere da es sich bei AHDS um eine Erkrankung handelt, bei der Hunde mit einem unkomplizierten Verlauf generell eine sehr schnelle Besserung der klinischen Symptome zeigen, ist es schwer, einen Unterschied im klinischen Verlauf zu zeigen. Ob das Probiotikum bei Hunden mit AHDS konsistent zu einer schnelleren klinischen Besserung führen kann, müsste daher durch Studien mit einer großen Patientenzahl evaluiert werden.

Bei Hunden mit AHDS, die keine Anzeichen eines SIRS zeigen, haben eine Therapie mit Amoxicillin/Clavulansäure oder eine Kombinationstherapie aus Amoxicillin/Clavulansäure und Metronidazol, verglichen mit rein symptomatischer Therapie, keine Vorteile hinsichtlich klinischem Verlauf, Kotkonsistenz, Länge des stationären Aufenthalts und Sterblichkeitsrate (ISRAILOFF, 2009; UNTERER et

al., 2011). Auch ein Vergleich zwischen einer singulären Therapie mit Amoxicillin/Clavulansäure und der Kombinationstherapie aus Amoxicillin/Clavulansäure und Metronidazol zeigte keine Unterschiede hinsichtlich des klinischen Verlaufs (ORTIZ et al., 2018). In der vorliegenden Studie besserten sich ebenfalls alle Studienteilnehmer ohne antibiotische Therapie innerhalb weniger Tage. Dennoch konnten Studien zeigen, dass bei vielen Patienten mit akutem Durchfall häufig eine antibiotische Therapie als Ersttherapie eingesetzt wird, ohne dass Anzeichen für ein SIRS bestehen (GERMAN et al., 2010; DE BRIYNE et al., 2014). Eine antibiotische Therapie sollte jedoch bei Patienten mit AHDS, die keinen Hinweis auf ein SIRS haben, aufgrund verschiedener Faktoren kritisch gesehen werden. In einer humanmedizinischen Studie konnte gezeigt werden, dass eine antibiotische Therapie während der Phase einer akuten Enteritis das Risiko erhöht, später chronische gastrointestinale Symptome zu entwickeln (KLEM et al., 2017). In der Tiermedizin wurde weiterhin festgestellt, dass Hunde, die im Welpenalter an einer Parvovirose erkrankt waren, einem signifikant höheren Risiko ausgesetzt sind, im Erwachsenenalter chronische gastrointestinale Beschwerden zu zeigen (KILIAN et al., 2018). Da an Parvovirose erkrankte Welpen neben der Enteritis in vielen Fällen eine Neutropenie entwickeln, sind diese einem höheren Risiko ausgesetzt, eine Sepsis zu entwickeln und werden daher in der Regel mit Antibiotika behandelt. Aus diesem Grund lässt sich nicht sagen, ob das erhöhte Risiko der chronischen gastrointestinalen Symptome nach einer Parvovirose mit der Erkrankung an sich oder der antibiotischen Therapie zusammenhängt (KILIAN et al., 2018). Ob Patienten mit AHDS gastrointestinale Langzeitfolgen nach der Erkrankung entwickeln und, ob es Unterschiede zwischen antibiotisch behandelten Tieren und rein symptomatisch behandelten gibt, ist Gegenstand laufender Studien. Weiterhin sollte eine antibiotische Therapie bei akutem Durchfall kritisch gesehen werden, da diese zu einer intestinalen Dysbiose führt. Dies konnte bei Hunden und Katzen sowie bei Menschen gezeigt werden (DETHLEFSEN et al., 2008; SUCHODOLSKI et al., 2009; GRONVOLD et al., 2010; JERNBERG et al., 2010; IGARASHI et al., 2014; FRANCINO, 2015; SUCHODOLSKI et al., 2016; TORRES-HENDERSON et al., 2017). In humanmedizinischen Studien wurden Veränderungen im intestinalen Mikrobiom auch noch Monate bis Jahre nach Absetzen der antibiotischen Therapie festgestellt (JAKOBSSON et al., 2010). Dies ist von besonderem Interesse, da in weiteren humanmedizinischen Studien gezeigt werden konnte, dass eine intestinale

Dysbiose, die durch antibiotische Therapie ausgelöst wurde, das Risiko erhöht, an einem Reizdarmsyndrom, einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung wie Morbus Crohn, an Allergien oder an Asthma zu erkranken (KUMMELING et al., 2007; UNGARO et al., 2014; METSALA et al., 2015; KLEM et al., 2017). Inwiefern eine antibiotische Therapie bei Hunden ähnliche Langzeitfolgen hat, ist derzeit nicht bekannt. Letztendlich sollten Antibiotika auch aufgrund von entstehenden bakteriellen Resistenzen, die sowohl für Tiere, als auch für Menschen aufgrund nicht-behandelbarer bakterieller Infektionen zunehmende gesundheitliche Gefahren darstellen, sinnvoll eingesetzt werden (COSTELLOE et al., 2010; SYKES, 2010).

Eine intestinale Dysbiose liegt nicht nur bei Patienten, die antibiotisch behandelt wurden vor, sondern konnte auch bei akuten und chronischen Darmerkrankungen festgestellt werden (SUCHODOLSKI, 2011; HONNEFFER et al., 2014; GUARD und SUCHODOLSKI, 2016). Bei chronischen Darmerkrankungen ist es unklar, ob die Dysbiose als Auslöser der Erkrankung gesehen werden kann, oder, ob diese sekundär zur zugrundeliegenden Erkrankung entsteht (SUCHODOLSKI, 2011). Bakterien, die aufgrund von Ergebnissen vorheriger Studien als Symbionten mit positivem Einfluss auf den Wirt gelten, sind im Rahmen einer Dysbiose in der Regel in verminderter Menge im Darm vorhanden, während Bakterien, die als Pathogene gelten oder negative Auswirkungen auf den Wirt haben können, überwuchern. Folglich können als gutartig angesehene Bakterien ihre Funktion nur in eingeschränkter Weise ausüben (SUCHODOLSKI, 2011). Folgen der intestinalen Dysbiose sind z. B. Veränderungen in Stoffwechselwegen, an denen Bakterien im gesunden Zustand teilhaben. Somit kommt es zu Abweichungen intestinaler Metaboliten, die folglich wichtige Funktionen im Darmtrakt und systemisch nur noch eingeschränkt erfüllen können (BRESTOFF und ARTIS, 2013). Weiterhin kann eine Dysbiose zu einer vermehrten Expression bakterieller Toxine führen und pro-inflammatorische Antworten des Immunsystems fördern, wobei vermutlich multiple Mechanismen zur gleichen Zeit stattfinden (FAVA und DANESE, 2011). Eine weitere Folge kann eine herabgesetzte intestinale Barriere sein, die durch Veränderungen in Enzymen des Bürstensaums und in Rezeptoren des intestinalen Epithels in Erscheinung tritt und somit den Wirt empfänglicher für den Übertritt von Pathogenen oder Toxinen macht (SUCHODOLSKI, 2011). Eine intestinale Dysbiose muss sich dennoch nicht zwangsläufig in klinischen Symptomen äußern

(JOOSSENS et al., 2011). Inwiefern eine asymptomatische intestinale Dysbiose bei Hunden empfänglicher für Pathogene macht oder für chronische gastrointestinale oder systemische Erkrankungen prädisponiert, ist derzeit nicht bekannt. Weiterhin kann derzeit nicht eindeutig geklärt werden, inwiefern eine intestinale Dysbiose neben der Überwucherung von *C. perfringens* bei Patienten mit AHDS eine Rolle in der Pathogenese spielt.

Zur Erfassung des Mikrobioms bei Hunden konnten ALSHAWAQFEH und Mitarbeiter (2017b), neben den 16S-rRNA-Sequenzierungsverfahren, ein neues qPCR-gestütztes Verfahren, den DI, entwickeln, mit dem die fäkale Menge sieben bakterieller Taxa sowie die gesamte Bakterienmenge untersucht wird. Mittels eines mathematischen Algorithmus werden die Ergebnisse als einzelne Zahl ausgedrückt, anhand derer das Mikrobiom in normobiotisch ($DI < 0$) oder dysbiotisch ($DI > 0$) eingeteilt werden kann. Je höher der DI ist, desto schwerwiegender ist die Dysbiose. Im Vergleich zu Sequenzierungsverfahren ist somit eine kostengünstigere und schnellere Erfassung des fäkalen Mikrobioms möglich. Im Rahmen der Studie von ALSHAWAQFEH und Mitarbeitern (2017b) wurde dieses Verfahren bei 95 gesunden Hunden sowie 106 Hunden mit chronischer Enteropathie etabliert. Bei der Entwicklung des Verfahrens wurden Bakteriengruppen miteinbezogen, die sowohl bei akuten, als auch bei chronischen gastrointestinalen Erkrankungen, im Vergleich zu gesunden Hunden, basierend auf 16S-rRNA-Sequenzierungsverfahren sowie qPCR, im Kot abweichend waren. Dabei wurden auch Studien miteinbezogen, in denen das fäkale Mikrobiom bei Hunden mit akuter blutiger Diarrhoe untersucht wurde (SUCHODOLSKI et al., 2012b; GUARD et al., 2015). In der vorliegenden Studie wiesen lediglich 4/13 (31 %) Hunden in der Probiotika-Gruppe und 4/10 (40 %) Hunden in der Placebo-Gruppe einen $DI > 0$, und somit laut der Einteilung nach ALSHAWAQFEH und Mitarbeitern (2017b) eine intestinale Dysbiose auf. Deutlich wurde zudem eine große Streuung des DI innerhalb der Gruppen. Im Verlauf der Studie kam es in beiden Gruppen zu einem Absinken des mittleren DI, welche jedoch statistisch keine Signifikanz erreichte. Am Studientag 21 zeigte lediglich ein Hund in der Placebo-Gruppe einen $DI > 0$ und auch die Streuung des DI fiel in beiden Gruppen deutlich geringer aus. Somit kann in der vorliegenden Patientenpopulation durchaus von einer Verbesserung des DI gesprochen werden. Dies ist die erste Studie, bei der das fäkale Mikrobiom an AHDS erkrankter Hunde mittels DI untersucht wurde. Der DI wurde bereits in

einigen veröffentlichten Studien verwendet, um das Mikrobiom zu untersuchen. Dabei konnte gezeigt werden, dass Hunde mit chronischer Enteropathie, mit behandelter oder unbehandelter EPI, Hunde, die gebartet wurden, sowie gesunde Hunde, die Tylosin erhielten, einen signifikant höheren DI im Vergleich zu gesunden Hunden aufwiesen, wobei auch hier in der Regel eine große Streuung des DI vorlag (GIARETTA et al., 2018; SCHMIDT et al., 2018; BLAKE et al., 2019). Derzeit gibt es zudem drei publizierte Studien, in denen das fäkale Mikrobiom sowohl mittels 16S-rRNA-Sequenzierung als auch mittels DI erfasst wurde, wodurch ein Vergleich beider Verfahren möglich ist. Bei Hunden mit chronischer Enteropathie, Hunden mit multizentrischem Lymphom sowie bei gesunden Hunden und Hunden, die mit Tylosin behandelt wurden, konnte mittels beider Verfahren gezeigt werden, dass diese eine Dysbiose aufwiesen, wobei jedoch keine direkte Korrelation der Ergebnisse beider Verfahren durchgeführt wurde (GAVAZZA et al., 2018; MANCHESTER et al., 2019; MINAMOTO et al., 2019). Mittels 16S-rRNA-Sequenzierung zeigte sich in einer vorherigen Studie, dass Hunde mit AHDS im Vergleich zu Hunden mit akutem nicht-blutigem Durchfall oder chronischer Enteropathie die tiefgreifendsten Veränderungen im fäkalen Mikrobiom aufwiesen (SUCHODOLSKI et al., 2012b). In der vorliegenden Studie wurde keine 16S-rRNA-Sequenzierung durchgeführt, weshalb letztendlich nicht eindeutig geklärt werden kann, ob die vorliegende Patientenpopulation tatsächlich keine tiefgreifende Dysbiose aufwies oder ob diese mit dem angewendeten Verfahren nicht erfasst werden konnte. Ob der DI also ein geeignetes Verfahren zur Erfassung einer Dysbiose bei Patienten mit AHDS darstellt, ist derzeit nicht geklärt und Gegenstand laufender Studien.

Neben der Information über das Vorliegen sowie den Grad einer Dysbiose wird im Rahmen des DI außerdem die Menge der einzelnen gemessenen Bakterien (*Faecalibacterium* spp., *Turicibacter* spp., *Streptococcus* spp., *E. coli*, *Blautia* spp., *Fusobacterium* spp. und *C. hiranonis*) angegeben (ALSHAWAQFEH et al., 2017b). ALSHAWAQFEH und Mitarbeiter (2017b) schlugen basierend auf ihren Ergebnissen Referenzwerte für die sieben bakteriellen Taxa für gesunde Hunde vor. An der vorliegenden Studie nahmen keine gesunden Hunde als Kontrollgruppe teil. Obwohl das gleiche qPCR-gestützte Verfahren wie von ALSHAWAQFEH und Mitarbeitern (2017b) verwendet wurde, ist ein direkter Vergleich der fäkalen Menge der bakteriellen Taxa mit den von ALSHAWAQFEH und Mitarbeitern

(2017b) vorgeschlagenen Referenzwerten nicht möglich. Ursächlich dafür ist, aufgrund der Normalverteilung, die Angabe der mittleren fäkalen Mengen in log DNA pro g Kot in der vorliegenden Studie und der medianen fäkalen Mengen in log DNA pro g Kot von ALSHAWAQFEH und Mitarbeitern (2017b). Dennoch zeigt sich in den vorliegenden Daten, dass bakterielle Taxa, die bei Hunden mit AHDS in vorherigen Studien im Vergleich zu gesunden Hunden abweichend waren, im Verlauf der vorliegenden Studie anstiegen bzw. absanken. SUCHODOLSKI und Mitarbeiter (2012b) sowie MARKEL und Mitarbeiter (2012) zeigten mittels qPCR, dass *Faecalibacterium* spp. und *Turicibacter* spp. bei Hunden mit akutem hämorrhagischem Durchfall in signifikant niedrigerer Menge im Kot nachgewiesen werden können im Vergleich zu gesunden Hunden. SUCHODOLSKI und Mitarbeiter (2012b) konnten zudem bei Hunden mit akutem hämorrhagischem Durchfall eine signifikant niedrigere Menge an *Blautia* spp. nachweisen, und die Kombination aus *Faecalibacterium* spp., *Turicibacter* spp. und *Blautia* spp. erwies außerdem die höchste Trennschärfe im Vergleich zwischen gesunden Hunden und Hunden mit akutem und chronischem Durchfall. Eine höhere Menge von *Faecalibacterium* spp., *Turicibacter* spp. und *Blautia* spp. im Kot scheint bei Hunden folglich sinnvoll, da sie mit einem gesunden Mikrobiom assoziiert wurde.

Faecalibacterium spp. spielen im SCFA-Metabolismus eine Rolle (KOH et al., 2016). In humanmedizinischen Studien konnten *Faecalibacterium* spp. als Butyrat-Produzenten identifiziert werden. Butyrat wirkt sich positiv auf die Darmbarriere des Kolons aus, indem es z. B. die Expression der Tight-Junction-Proteine steigert und eine regulierende Wirkung auf Zellproliferation und -apoptose des Darmepithels hat (PLOGER et al., 2012). In einer Studie an Hunden mit akutem Durchfall wurde unerwartet ein gegenteiliger Effekt beobachtet, da reduzierte Mengen an Ruminococcaceae und *Faecalibacterium* spp. mit reduzierten Mengen an fäkalem Propionat und erhöhten Mengen an Butyrat korrelierten, wobei vermutet wurde, dass Hunde mit akutem Durchfall Butyrat nicht adäquat verstoffwechseln können und daher vermehrt ausscheiden (GUARD et al., 2015). Eine weitere Studie zeigte, dass Hunde mit IBD, die therapeutisch gut eingestellt waren und somit keine oder kaum klinische Symptome zeigten, eine höhere Menge von *Faecalibacterium* spp. im Kot aufwiesen als Hunde mit schlecht eingestellter IBD (SUCHODOLSKI et al., 2012b). In einer weiteren Studie an Hunden mit IBD

wurde beobachtet, dass eine singuläre Therapie mit dem gleichen Probiotikum, das in der vorliegenden Studie verwendet wurde, mit einer signifikanten Erhöhung der Menge an *Faecalibacterium* spp. im Kot assoziiert war, während bei Hunden, die mit Metronidazol und Prednison behandelt wurden, keine Erhöhung dieses Bakteriums festgestellt werden konnte (ROSSI et al., 2014). Zudem zeigten HEILMANN und Mitarbeiter (2017), dass es bei Hunden mit AHDS unter rein symptomatischer Therapie zu keinem Anstieg fäkaler *Faecalibacterium* spp. innerhalb der ersten drei Tage der Erkrankung kommt. In der vorliegenden Studie zeigten *Faecalibacterium* spp. nur in der Probiotika-Gruppe einen signifikanten Anstieg, während in der Placebo-Gruppe kein signifikanter Anstieg im Verlauf der Studie festgestellt werden konnte. Ein positiver Einfluss auf *Faecalibacterium* spp. durch das verwendete Probiotikum scheint somit möglich. *Turicibacter* spp. konnten bisher sowohl bei Tieren als auch bei Menschen im Kot detektiert werden. Die genaue Funktion des Bakteriums ist derzeit jedoch nicht geklärt (CUIV et al., 2011). Eine Studie an Ratten konnte eine Korrelation zwischen *Turicibacter* spp. im Kot und Butyrat feststellen, weshalb vermutet wird, dass *Turicibacter* spp. ebenfalls eine Rolle im SCFA-Metabolismus spielen (ZHONG et al., 2015). Weiterhin wurde in einem Mäuseversuch gezeigt, dass *Turicibacter* spp. im Steroid- und Fettmetabolismus mitzuwirken scheinen (HOFFMAN und MARGOLIS, 2019). *Blautia* spp. repräsentieren bei gesunden Hunden 8,9 – 25,2 % (median 14,0 %) der intestinalen Bakterien und können auch bei gesunden Menschen in hoher Menge im Kot nachgewiesen werden (GUARD et al., 2015; TOUYAMA et al., 2015). Sie spielen eine Rolle im Glukose-Metabolismus und können Metaboliten wie Acetat, Ethanol, Lactat und Succinat bilden (LIU et al., 2008). In humanmedizinischen Studien konnte gezeigt werden, dass eine reduzierte Menge an *Blautia* spp. im Kot z. B. einen negativ prognostischen Faktor bei Brustkrebs im frühen Stadium darstellt und mit erhöhtem Risiko von Abstoßungsreaktionen nach Blut- und Knochenmarkstransplantationen einhergeht (JENQ et al., 2015; LUU et al., 2017). *Blautia* spp. sind zudem in der Lage, Metaboliten mit antimikrobieller Aktivität, sogenannte Lantibiotika, zu bilden, die *in vitro* eine hemmende Wirkung auf *C. perfringens* und *C. difficile* zeigten (HATZIIOANOU et al., 2017). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass *Blautia* spp. und *Turicibacter* spp. sowohl in der Probiotika-Gruppe als auch in der Placebo-Gruppe im Verlauf der Studie signifikant anstiegen, wobei in der Probiotika-Gruppe ein schnellerer Anstieg verzeichnet werden konnte als in der

Placebo-Gruppe. Der Anstieg kann somit als Normalisierung dieser bakteriellen Spezies interpretiert werden. Die beschleunigte Normalisierung scheint mit der probiotischen Therapie assoziiert zu sein. In einer humanmedizinischen Studie zu probiotischer Therapie während der Schwangerschaft konnte ein gegenteiliger Effekt auf *Turicibacter* spp. beobachtet werden, da bei Frauen, die ein Probiotikum erhielten, die fäkale Menge an *Turicibacter* spp. während der Therapie signifikant gegenüber der Kontrollgruppe sank (CHEN et al., 2019). Hinsichtlich *Blautia* spp. konnte in einer *In-vitro*-Studie, bei der der Einfluss einer autologen Kottransplantation versus mehrstämmige Probiotika-Therapie auf fäkale murine Mikrobiota nach Antibiotika-Therapie untersucht wurde, ein ähnlicher Effekt wie in der vorliegenden Studie beobachtet werden. Hier kam es in der Probiotika-Gruppe zu einem signifikanten Anstieg der *Blautia* spp., der in der Gruppe der autologen Kottransplantation nicht festgestellt werden konnte (SUEZ et al., 2018).

C. hiranonis ist ein Bakterium, das eine Rolle im GS-Metabolismus spielt, indem es mittels 7-alpha-Dehydroxylierung die Umsetzung von primären zu sekundären Gallensäuren im Kolon bewerkstelligt (KITAHARA et al., 2001). In vorherigen Studien konnte bei Hunden eine signifikante Korrelation zwischen der Menge an *C. hiranonis* und sekundärer GS im Kot festgestellt werden (GIARETTA et al., 2018). Hunde mit chronischer Enteropathie wiesen, verglichen mit gesunden Hunden, signifikant niedrigere Mengen an *C. hiranonis* im Kot auf und, konsistent dazu, auch signifikant niedrigere Mengen an fäkalen sekundären GS (GIARETTA et al., 2018; GUARD et al., 2019). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es bei Hunden mit chronischer Enteropathie unter Therapie mit Glukokortikoiden zu einem Anstieg von *C. hiranonis* sowie sekundärer GS kommt (GUARD et al., 2019). Da ein normaler GS-Metabolismus eine große Rolle für die Gesundheit des Wirtes spielt, erscheint eine Normalisierung des GS-umwandelnden Bakteriums *C. hiranonis* sinnvoll. Hinsichtlich der fäkalen Menge von *C. hiranonis* konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass es bei allen Studienteilnehmern im Verlauf der Studie zu einem signifikanten Anstieg des Bakteriums kam. In der Probiotika-Gruppe kam es wiederum zu einem schnelleren Anstieg als in der Placebo-Gruppe, weshalb ein positiver Einfluss des verwendeten Probiotikums auf *C. hiranonis* möglich ist. Der Einfluss von Probiotika auf *C. hiranonis* wurde bisher wenig untersucht. In einem *In-vitro*-Versuch konnte gezeigt werden, dass ein einstämmiges Probiotikum mit *B. pseudocatenulatum* G4 einen inhibitorischen

Effekt auf *C. hiranonis* zeigte, wobei vermutet wurde, dass dieser Effekt durch die Senkung des pH-Wertes durch die Produktion von Milch- und Essigsäure durch *B. pseudocatenulatum* G4 verursacht wurde (RASTI et al., 2013).

MARKEL und Mitarbeiter (2012) zeigten, dass *Streptococcus* spp. im Kot im Vergleich zu gesunden Hunden in signifikant niedrigerer Menge bei Hunden mit akutem hämorrhagischem Durchfall und in signifikant höherer Menge bei Hunden mit chronischer Enteropathie nachgewiesen werden können. In der vorliegenden Studie zeigte sich in der Probiotika-Gruppe ein signifikanter Anstieg der *Streptococcus* spp. im Kot im Verlauf der Studie, während es in der Placebo-Gruppe zu keinem signifikanten Anstieg kam. Eine mögliche Erklärung für diese Entwicklung ist der im verwendeten Probiotikum enthaltene bakterielle Stamm *S. thermophilus* DSM 24731. Ähnliche Ergebnisse konnten bereits in vorherigen Studien gezeigt werden, bei denen es z. B. in einem Mäuseversuch nach probiotischer Therapie zu einem signifikanten Anstieg der *Streptococcus* spp. kam (SUEZ et al., 2018). Die erhöhten Mengen im Kot können als Passage des Bakteriums durch den Gastrointestinaltrakt interpretiert werden.

MARKEL und Mitarbeiter (2012) konnten mittels qPCR zudem zeigen, dass Hunde mit AHDS sowie Hunde mit chronischer Enteropathie signifikant höhere fäkale Mengen an *E. coli* verglichen mit gesunden Hunden aufweisen. In anderen Studien konnte wiederum keine erhöhte Menge an *E. coli* bei Hunden mit AHDS festgestellt werden (SUCHODOLSKI et al., 2012b; GUARD et al., 2015). *E. coli* stellt einen Kommensalen des Gastrointestinaltraktes dar und konnte somit auch bei jedem Studienteilnehmer in der vorliegenden Studie detektiert werden (MARKS et al., 2011). Eine Überwucherung von *E. coli* scheint in der vorliegenden Studienpopulation keine Rolle im Krankheitsprozess zu spielen, da die fäkale Menge an *E. coli* über den Verlauf der Studie nahezu gleich blieb. *Fusobacterium* spp. stellen bei gesunden Hunden einen festen Bestandteil im intestinalen Mikrobiom dar, während bei Menschen höhere Mengen an *Fusobacterium* spp. mit IBD und Dickdarmkrebs assoziiert waren (VAZQUEZ-BAEZA et al., 2016). Bei Hunden konnte gezeigt werden, dass die fäkalen Mengen an Fusobacteria bei Hunden mit IBD signifikant niedriger sind, während sie bei Hunden mit akutem hämorrhagischem Durchfall höher sind als bei gesunden Hunden, jedoch ohne statistische Signifikanz (SUCHODOLSKI et al., 2012b). Die fäkale Menge an *Fusobacterium* spp. blieb über den Verlauf der vorliegenden

Studie nahezu gleich. Hinsichtlich der fäkalen Mengen von *E. coli* und *Fusobacterium* spp. konnte zwischen den Studiengruppen kein Unterschied festgestellt werden, weshalb ein Einfluss des Probiotikums auf *E. coli* und *Fusobacterium* spp. in der vorliegenden Studie unwahrscheinlich erscheint.

Die Pathogenese des AHDS ist derzeit nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass *C. perfringens* sowie toxinbildende *C. perfringens* eine Rolle im Krankheitsprozess des AHDS spielen. *C. perfringens* ist ein Kommensale des Gastrointestinaltraktes und kann somit bei gesunden Hunden und Hunden mit gastrointestinaler Erkrankung im Kot nachgewiesen werden (WEESE et al., 2001; MARKS et al., 2002; MINAMOTO et al., 2014b). In Übereinstimmung dazu konnte in der vorliegenden Studie ebenfalls im Kot jedes Studienteilnehmers *C. perfringens* mittels qPCR detektiert werden. Im Vergleich zu gesunden Hunden kann *C. perfringens* jedoch bei Hunden mit AHDS im Kot in einer signifikant höheren Menge gefunden werden (MARKEL, 2012; SUCHODOLSKI et al., 2012b; MINAMOTO et al., 2014b; BUSCH et al., 2015). Eine niedrigere Menge an fäkalen *C. perfringens* liegt somit im gesunden Zustand vor, weshalb eine Minderung der Menge an *C. perfringens* sinnvoll erscheint. Als Ursache für die Überwucherung von *C. perfringens* wird unter anderem eine primär vorliegende intestinale Dysbiose, die zu Veränderungen der protektiven Mikrobiota führt, diskutiert (WEESE et al., 2001). Da in der vorliegenden Studie keine gesunden Tiere als Kontrollgruppe teilnahmen, lassen die Ergebnisse bezüglich der fäkalen Mengen an *C. perfringens* nur eine Interpretation des Verlaufs innerhalb der Studiengruppen zu. Es konnte festgestellt werden, dass es in der Probiotika-Gruppe im Verlauf der Studie zu einer signifikanten Reduktion der Menge fäkaler *C. perfringens* kam. In der Placebo-Gruppe wiederum kam es zunächst zu einer Reduktion und dann zu einem erneuten Anstieg der fäkalen *C. perfringens*, wobei in der statistischen Auswertung an keinem Studientag ein signifikanter Unterschied zu Studientag 0 verzeichnet werden konnte. Im Rahmen vorheriger Studien konnten ebenfalls *cpe* im Kot gesunder Hunde nachgewiesen werden, jedoch weniger häufig und in signifikant geringeren Mengen als bei Hunden mit AHDS (MINAMOTO et al., 2014b; BUSCH et al., 2015). Warum es bei AHDS zu einer Überwucherung der *cpe* kommt, ist derzeit nicht geklärt. In einer Studie von MINAMOTO und Mitarbeitern (2014b) wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen intestinaler Dysbiose und dem Vorhandensein fäkaler *cpe* oder CPE bei Hunden

mit AHDS besteht. Hierbei konnte kein Unterschied hinsichtlich der mittels qPCR gemessenen gesamten Bakterienmenge sowie spezifischer Bakterien (*Fusobacteria*, *Ruminococcaceae*, *Bifidobacterium* spp., *Blautia* spp., *Faecalibacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *E. coli*) festgestellt werden, woraus geschlossen wurde, dass die Anwesenheit des *cpe* oder CPE unabhängig von einer zugrundeliegenden intestinalen Dysbiose ist. Bei Hunden mit AHDS wurde eine Prävalenz von 48 – 65 % für *cpe* in der Literatur beschrieben (MINAMOTO et al., 2014b; BUSCH et al., 2015). In der vorliegenden Studie waren an Tag 0 17/23 (74 %) Hunde positiv für *cpe* und somit mehr Hunde positiv als bisher beschrieben wurde. Im Verlauf konnte zunächst von Tag 0 zu Tag 7 in beiden Studiengruppen eine signifikante Reduktion der *cpe* beobachtet werden, wobei es danach in der Probiotika-Gruppe zu einer weiteren signifikanten Reduktion kam, während die Menge von *cpe* in der Placebo-Gruppe wieder anstieg. Weiterhin konnten *cpe* am 21. Studientag signifikant häufiger bei Hunden der Placebo-Gruppe nachgewiesen werden als bei Hunden der Probiotika-Gruppe. Ein Einfluss des Probiotikums auf *C. perfringens* und *cpe* scheint in der vorliegenden Studie somit möglich. Ähnliche Beobachtungen konnten bereits in vorherigen Studien verzeichnet werden. So konnte in *In-vitro*-Studien gezeigt werden, dass verschiedene *Lactobacillus* spp. in der Lage sind, das Wachstum von *C. perfringens* zu hemmen sowie die alpha-Toxin- und beta2-Toxin-Produktion zu mindern (ALLAART et al., 2011; GUO et al., 2017). Als zugrundeliegender Mechanismus wurde in diesen Studien die Absenkung des pH-Wertes durch die Säureproduktion der *Lactobacillus* spp. diskutiert. *In vivo* konnte bei Mäusen, Hühnern und Schweinen gezeigt werden, dass die Behandlung mit verschiedenen probiotischen Stämmen mit einer Wachstumshemmung von *C. perfringens* assoziiert war (DUCLUZEAU et al., 1976; FUKATA et al., 1991; SIGGERS et al., 2008). Auch bei gesunden Hunden, die mit *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 und *E. faecium* CECT 4515 behandelt wurden, konnte im Kot eine signifikant niedrigere Menge an *C. perfringens* mittels bakterieller Kultur, verglichen mit nicht behandelten Hunden, gemessen werden (GONZALEZ-ORTIZ et al., 2013). BIAGI und Mitarbeiter (2007) konnten zwar *in vitro* ein gehemmtes Wachstum von *C. perfringens* in mit *L. animalis* LA4 inkubiertem Kot beobachten, diesen Effekt jedoch *in vivo* bei gesunden Hunden, die mit dem gleichen *Lactobacillus*-Stamm behandelt wurden, nicht reproduzieren. In einer weiteren Studie an Hunden mit akutem unkompliziertem Durchfall, die mit verschiedenen *Lactobacillus* spp. behandelt wurden, konnte eine geminderte

Menge Alphatoxin-produzierender *C. perfringens* im Kot mittels qPCR festgestellt werden (GOMEZ-GALLEGO et al., 2016). Denkbar wäre, dass in der vorliegenden Studie ebenfalls eine Absenkung des pH-Wertes durch die im Probiotikum enthaltenen vier Laktobazillen-Stämme zur Minderung von *C. perfringens* und *cpe* beigetragen hat.

Zusammenfassend konnte also bezüglich der Entwicklung der fäkalen Mengen von *Faecalibacterium* spp., *Turicibacter* spp., *Blautia* spp., *C. hiranonis* spp. sowie *C. perfringens* und enterotoxinbildenden *C. perfringens* ein positiver Einfluss unter Verwendung des mehrstämmigen Probiotikums beobachtet werden. Eine schnelle Normalisierung der intestinalen Mikrobiota sollte aufgrund der lokalen und systemischen Folgen sowie den in humanmedizinischen Studien beobachteten möglichen Langzeitfolgen durch Abweichungen der intestinalen Mikrobiota angestrebt werden. Deshalb erscheint eine Therapie mit dem verwendeten probiotischen Präparat bei Patienten mit AHDS sinnvoll. Es ist zu betonen, dass zugrundeliegende Wirkmechanismen des Probiotikums in der vorliegenden Studie nicht untersucht wurden. Mechanismen, die in vorherigen Studien als Erklärung für ähnliche Effekte auf die intestinale Mikrobiota interpretiert wurden, sind zwar auch in der vorliegenden Studie möglich, können aber nicht direkt übertragen werden. Ursächlich dafür ist, dass jeder probiotische Bakterienstamm spezifische Wirkungsweisen hat und sogar verschiedene Bakterienstämme derselben Bakterienart unterschiedliche Wirkungen haben können (HART et al., 2004; THOMAS und VERSALOVIC, 2010; SCHMITZ und SUCHODOLSKI, 2016). Bei Patienten mit AHDS liegt neben der intestinalen Dysbiose zudem eine Entzündung und Nekrose des Darms vor, weshalb diese Patienten eine herabgesetzte Darmbarriere aufweisen (UNTERER et al., 2014). Da das verwendete probiotische Präparat in vorherigen Studien positive Effekte auf die Darmbarriere sowie immunologische Reaktionen zeigte, erscheint der Einsatz des verwendeten Probiotikums ebenfalls zweckmäßig (ROSSI, 2014; WHITE et al., 2017; ROSSI et al., 2018). In wie fern das verwendete probiotische Präparat sich möglicherweise positiv auf eine intestinale Entzündung und Nekrose bei Hunden mit AHDS auswirken kann, wurde jedoch in der vorliegenden Studie nicht untersucht. In zukünftigen Studien sollte untersucht werden, ob sich auch bei Hunden mit AHDS durch probiotische Therapie ähnlich positive Effekte auf die Darmbarriere und immunologische Reaktionen, wie sie in vorherigen Studien

gezeigt werden konnten, reproduziert lassen.

Die kürzlich beschriebenen *netF*, die aus dem Kot eines Hundes, der an den Folgen einer akuten hämorrhagischen Diarrhoe verstarb, isoliert werden konnten, scheinen zudem eine Rolle in der Pathogenese des AHDS zu spielen (MEHDIZADEH GOHARI et al., 2015). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass *netF* signifikant häufiger bei Hunden mit AHDS detektiert werden konnte, verglichen mit gesunden Hunden und auch Hunden mit anderen gastrointestinalen Erkrankungen (MEHDIZADEH GOHARI et al., 2015; LEIPIG-RUDOLPH et al., 2018; SARWAR et al., 2018; SINDERN et al., 2019). Bei Hunden mit AHDS lag in diesen Studien die Prävalenz *netF*-positiver Hunde bei 45 – 100 %, während bei 0 – 12 % der gesunden Hunde *netF* nachgewiesen werden konnte. In der vorliegenden Studie konnten am Studientag 0 bei 57 % der Hunde *netF* im Kot gefunden werden, womit dieses Ergebnis konsistent zu vorherigen Studien ist. Aufgrund der hohen Prävalenz der Toxin-Gene bei Hunden mit AHDS und der niedrigeren Prävalenz bei sowohl gesunden Tieren als auch Tieren mit anderen gastrointestinalen Erkrankungen, scheinen *netF* eine Rolle in der Pathogenese des AHDS zu spielen. Dennoch können diese Toxin-Gene selten auch bei gesunden Tieren detektiert werden. Weiterhin weist nicht jeder Hund, der an AHDS erkrankt, diese Toxin-Gene im Kot auf. Daher können NetF-Toxin-bildende *C. perfringens* alleine nicht als auslösende Faktoren in der Pathogenese des AHDS angesehen werden. Auch in der Geflügelmedizin konnte eine Assoziation zwischen dem Vorliegen des sogenannten NetB-Toxin-Gens und der Nekrotischen Enteritis der Masthühner festgestellt werden (KEYBURN et al., 2008). Eine alleinige Infektion mit einem NetB-Toxin-produzierenden *C.-perfringens*-Stamm führt jedoch nicht zwangsläufig zum Ausbruch der Erkrankung (YANG et al., 2019). Als prädisponierende Faktoren für die Entstehung der Nekrotischen Enteritis konnte vor allem eine Co-Infektion mit *Eimeria* identifiziert werden. Weiterhin zeigen Tiere mit *Eimeria*-Co-Infektion einen schwereren Krankheitsverlauf als Tiere ohne *Eimeria*-Co-Infektion (RODGERS et al., 2015; YANG et al., 2019). Zudem kann eine zusätzliche proteinreiche Fütterung durch Fischmehl zu einer weiteren Erhöhung des Risikos der Entstehung der Nekrotischen Enteritis beitragen (RODGERS et al., 2015). Als möglicher zugrundeliegender Mechanismus wurde diskutiert, dass vor allem eine *Eimeria*-Infektion zu einer signifikanten intestinalen Dysbiose führt, die dann wiederum zur Induktion der Erkrankung beiträgt (WU et

al., 2010; STANLEY et al., 2014). In der vorliegenden Studie wurden intestinale Parasiten mittels Kotflotation und Giardien-Antigen-ELISA ausgeschlossen, weshalb eine Co-Infektion mit Endoparasiten als prädisponierender Faktor unwahrscheinlich erscheint. Es wurde bisher nicht untersucht, ob Hunde, die AHDS entwickeln, bereits vor Ausbruch der Erkrankung eine zugrundeliegende Dysbiose aufweisen, die zur Entstehung der Erkrankung beitragen könnte. Ebenso ist nicht bekannt, ob es einen Zusammenhang zwischen einer Dysbiose und dem Vorliegen von *netF* bei Hunden gibt. Zudem konnten bisher, nach dem besten Wissen der Autorin, auch keine möglichen Co-Faktoren, die zur Entstehung des AHDS beitragen, gefunden werden. In der vorliegenden Studie wurde zudem erstmalig der zeitliche Verlauf der *netF* bei Hunden mit AHDS beschrieben. Hierbei kam es in beiden Gruppen zu einer signifikanten Reduktion der Toxin-Gene, wobei am 21. Studientag lediglich bei einem Hund der Placebo-Gruppe *netF* festgestellt werden konnten. Signifikante Unterschiede konnten zwischen den Gruppen nicht festgestellt werden. Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, dass das Probiotikum entweder keinen Einfluss auf *netF* nimmt oder, dass ein Einfluss in der vorliegenden Studie nicht detektiert werden konnte. Ein möglicher Grund warum ein Einfluss verpasst worden sein könnte, ist, dass die NetF-Toxin-Gene einen rapiden Abfall zwischen Studientag 0 und 7 zeigten und somit innerhalb dieses Zeitraums Unterschiede zwischen den Studiengruppen möglicherweise nicht festgestellt werden konnten. Weiterhin scheint das Vorhandensein der *netF* selbstlimitierend zu sein, da keiner der Studienteilnehmer eine antibiotische Therapie erhielt und es dennoch zu der rapiden Abnahme der Clostridien, die für NetF-Toxin kodieren, kam. Bezüglich der Methodik der vorliegenden Studie sollte betont werden, dass die *C. perfringens*-Stämme, die für Enterotoxin und NetF-Toxin kodieren, gemessen wurden und nicht die Toxine an sich. Ob es nun unter Anwesenheit von *cpe* oder *netF* in der vorliegenden Studienpopulation zu einer Expression der Toxine kam, kann somit letztendlich nicht geklärt werden.

Ob das Vorliegen Toxin-bildender *C. perfringens* einen Einfluss auf die klinische Symptomatik bei Hunden mit AHDS hat, wurde in der vorliegenden Studie nicht untersucht. Dass *cpe* jedoch keinen Einfluss auf die klinische Symptomatik des AHDS zu haben scheinen, wurde bereits in vorherigen Studien beschrieben, die keinen Unterschied hinsichtlich des klinischen Verlaufs zwischen Hunden, bei denen *cpe* nachgewiesen bzw. nicht nachgewiesen werden konnten, feststellen

konnten (MINAMOTO et al., 2014b; BUSCH et al., 2015). In einer weiteren Studie hatte auch das Vorliegen der *netF* bei Hunden mit AHDS keinen Einfluss auf den klinischen Verlauf (SINDERN et al., 2019). In der vorliegenden Studie zeigten beide Gruppen eine signifikante Reduktion der *cpe* von Studientag 0 zu 7. Auch die *netF* sanken in beiden Gruppen gleichermaßen rapide von Tag 0 zu Tag 7. Der Verlauf beider Toxin-Gene zeigte somit einen ähnlichen Verlauf wie der Krankheitsaktivitätsindex. Ein Unterschied hinsichtlich klinischer Symptomatik zwischen *netF*-/*cpe*-positiven und -negativen Hunden wurde in der vorliegenden Studie jedoch nicht untersucht.

Die Aussagefähigkeit der Ergebnisse der vorliegenden Studie erfährt ihre Begrenzung in der kleinen Studienpopulation. Im Rahmen dieser Studie wurde keine 16S-rRNA-Sequenzierung durchgeführt, die eventuell einen umfassenderen Einblick in das komplexe fäkale Mikrobiom gewährleistet hätte, als die in der Studie angewendete qPCR. In zukünftigen Studien sollte evaluiert werden, ob der in der vorliegenden Studie verwendete DI sich eignet, um eine Dysbiose bei Patienten mit AHDS festzustellen. Dennoch konnte einerseits mit Hilfe der angewendeten qPCR eine Quantifizierung der sieben gemessenen fäkalen Bakteriengruppen durchgeführt werden, andererseits wurde so eine Verlaufskontrolle der Werte ermöglicht. Der Zeitabstand von einer Woche zwischen der initialen Analyse des Mikrobioms und der ersten Verlaufskontrolle stellt eine weitere Limitation dar. Da Patienten mit AHDS eine schnelle Besserung innerhalb der ersten Tage zeigen, ist es denkbar, dass wichtige Entwicklungen der fäkalen Mikrobiota in diesem Zeitraum und somit mögliche Effekte des Probiotikums darauf verpasst wurden. Insbesondere im Verlauf der *netF* kam es zu einer rapiden Reduktion zwischen Studientag 0 und 7, weshalb ein Einblick in diesen Zeitraum wünschenswert gewesen wäre. Größer angelegte Studien mit engmaschigerer Kontrolle der fäkalen Mikrobiota könnten in Zukunft detailliertere Einblicke in mögliche Mechanismen in der Pathogenese des AHDS sowie in mögliche Effekte eines Probiotikums bieten.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser randomisierten, geblindeten, placebokontrollierten Studie war es, den Einfluss eines mehrstämmigen Probiotikums auf den klinischen Verlauf, das fäkale Mikrobiom sowie die fäkale Menge an *C. perfringens* und Toxin-bildenden *C. perfringens* mit Hilfe einer qPCR bei Hunden mit AHDS zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde der klinische Verlauf über acht Tage mittels eines Krankheitsaktivitätsindexes ermittelt, und es wurden drei Kotproben an Studientag 0, 7 und 21 zu Analysezwecken gesammelt.

In beiden Gruppen kam es innerhalb weniger Tage ohne antibiotische Therapie zu einer deutlichen Besserung klinischer Symptome, wobei es in der Probiotika-Gruppe gegenüber Tag 0 bereits am dritten Studientag zu einer signifikanten Verbesserung kam, während die Tiere der Placebo-Gruppe am vierten Studientag eine signifikante Verbesserung zeigten. Hunde, die mit dem Probiotikum behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu Hunden, die das Placebo erhielten, einen signifikanten Anstieg der fäkalen *Blautia* spp., *Faecalibacterium* spp., *C. hiranonis* spp. und *Turicibacter* spp. sowie eine signifikant niedrigere fäkale Menge an *C. perfringens* von Studientag 0 auf Studientag 7. Weiterhin konnte in der Probiotika-Gruppe im Vergleich zur Placebo-Gruppe eine signifikant niedrigere Menge an Enterotoxin-bildenden *C. perfringens* an Studientag 21 beobachtet werden. Zu Beginn der Studie konnten bei 57 % der Studienteilnehmer NetF-Toxin-bildende *C. perfringens* nachgewiesen werden. In beiden Gruppen kam es zu einer rapiden Abnahme der fäkalen NetF-Toxin-Gene, ohne signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

Die Ergebnisse dieser Studie sprechen dafür, dass es bei Hunden mit AHDS unter Behandlung mit dem angewendeten Probiotikum zu einer beschleunigten Normalisierung der als gutartig geltenden Mikrobiota kommt. Weiterhin scheint es eine beschleunigte Abnahme an *C. perfringens* und Enterotoxin-bildenden *C. perfringens*, die eine Rolle in der Pathogenese des AHDS spielen, zu unterstützen. Unabhängig von der probiotischen Therapie zeigen Hunde mit AHDS zeitgleich zur klinischen Besserung eine rapide Abnahme der NetF-Toxin-bildenden *C. perfringens*.

VI. SUMMARY

The aim of this randomized, blinded, placebo-controlled study was to investigate the effects of a multi-strain probiotic on the clinical course, the fecal microbiome, and the fecal abundance of *C. perfringens* and toxin-producing *C. perfringens* in dogs with AHDS. For this purpose, the clinical course was evaluated over eight days using a disease activity index, and three fecal samples were collected on study days 0, 7 and 21 for qPCR.

In both groups, a rapid improvement in clinical signs was observed within a few days without antibiotic therapy. A significant improvement in clinical scores was seen on study day 3 in the probiotic group and on day 4 in the placebo group compared to day 0.

Dogs treated with the probiotic showed a significant increase in the abundance of fecal *Blautia* spp., *Faecalibacterium* spp., *C. hiranonis* spp., and *Turicibacter* spp. and a significant decrease in the fecal abundance of *C. perfringens* from day 0 to day 7. Furthermore, a significantly lower abundance of enterotoxin-producing *C. perfringens* was observed in the probiotic group compared to the placebo group on study day 21. On day 0, 57 % of the study participants were positive for NetF-toxin-producing *C. perfringens*, which showed a rapid decrease in the fecal abundance in both groups, with no significant difference between groups.

The results of this study suggest that dogs with AHDS show an accelerate normalization of the microbiota considered as beneficial. Furthermore, the probiotic seems to support an accelerated decrease in *C. perfringens* and enterotoxin-producing *C. perfringens*, which play a role in the pathogenesis of AHDS. Dogs with AHDS show a rapid decrease in NetF-toxin-producing *C. perfringens* regardless of the probiotic therapy and the decrease seems to parallel the clinical improvement.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Anon. Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung. Amtsblatt der Europäischen Union L 268/29.

Anon. Verordnung (EG) Nr. 429/2008 der Kommission vom 25. April 2008 mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der Erstellung und Vorlage von Anträgen sowie der Bewertung und Zulassung von Futtermittelzusatzstoffen. Amtsblatt der Europäischen Union L 133/1.

Alakomi HL, Skytta E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, Helander IM. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 2001-5.

Allaart JG, van Asten AJ, Vernooij JC, Grone A. Effect of *Lactobacillus fermentum* on beta2 toxin production by *Clostridium perfringens*. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77: 4406-11.

Allenspach K, House A, Smith K, McNeill FM, Hendricks A, Elson-Riggins J, Riddle A, Steiner JM, Werling D, Garden OA, Catchpole B, Suchodolski JS. Evaluation of mucosal bacteria and histopathology, clinical disease activity and expression of Toll-like receptors in German shepherd dogs with chronic enteropathies. *Vet Microbiol* 2010; 146: 326-35.

Alonzo F, 3rd, Torres VJ. The bicomponent pore-forming leucocidins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2014; 78: 199-230.

Alshawaqfeh MK, Bashaireh A, Serpedin E, Suchodolski JS. Consistent metagenomic biomarker detection via robust PCA. *Biol Direct* 2017a; 12: 4.

AlShawaqfeh MK, Wajid B, Minamoto Y, Markel M, Lidbury JA, Steiner JM, Serpedin E, Suchodolski JS. A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal

samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy. FEMS Microbiol Ecol 2017b; 93

Altenhoefer A, Oswald S, Sonnenborn U, Enders C, Schulze J, Hacker J, Oelschlaeger TA. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens. FEMS Immunol Med Microbiol 2004; 40: 223-9.

Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev 1995; 59: 143-69.

Anderson RC, Cookson AL, McNabb WC, Park Z, McCann MJ, Kelly WJ, Roy NC. *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. BMC Microbiol 2010; 10: 316.

Anderson S. Shotgun DNA sequencing using cloned DNase I-generated fragments. Nucleic Acids Res 1981; 9: 3015-27.

Ansorge WJ. Next-generation DNA sequencing techniques. N Biotechnol 2009; 25: 195-203.

Appel-da-Silva MC, Narvaez GA, Perez LRR, Drehmer L, Lewgoy J. *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* fungemia following probiotic treatment. Med Mycol Case Rep 2017; 18: 15-7.

Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veecken J, deRoos P, Liu H, Cross JR, Pfeffer K, Coffey PJ, Rudensky AY. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. Nature 2013; 504: 451-5.

Arrieta MC, Finlay B. The intestinal microbiota and allergic asthma. J Infect 2014; 69 Suppl 1: S53-5.

Arsilan HH, Saripinar Aksu D, Terzi G, Nisbet C. Therapeutic effects of probiotic

- bacteria in parvoviral enteritis in dogs. *Revue Med Vet (Toulouse)* 2012; 2: 55-9.
- Asahara T, Shimizu K, Nomoto K, Hamabata T, Ozawa A, Takeda Y. Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 2004; 72: 2240-7.
- Ashraf R, Shah NP. Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2014; 54: 938-56.
- Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005; 307: 1915-20.
- Baillon ML, Marshall-Jones ZV, Butterwick RF. Effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* strain DSM13241 in healthy adult dogs. *Am J Vet Res* 2004; 65: 338-43.
- Balvociute M, Huson DH. SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT - how do these taxonomies compare? *BMC Genomics* 2017; 18: 114.
- Banay GL. An Introduction to Medical Terminology I. Greek and Latin Derivations. *Bull Med Libr Assoc* 1948; 36: 1-27.
- Bansal T, Alaniz RC, Wood TK, Jayaraman A. The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 228-33.
- Barko PC, McMichael MA, Swanson KS, Williams DA. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *J Vet Intern Med* 2018; 32: 9-25.
- Bassaganya-Riera J, Viladomiu M, Pedragosa M, De Simone C, Carbo A, Shaykhutdinov R, Jobin C, Arthur JC, Corl BA, Vogel H, Storr M, Hontecillas R. Probiotic bacteria produce conjugated linoleic acid locally in the gut that targets macrophage PPAR gamma to suppress colitis. *PLoS ONE* 2012; 7: e31238.
- Bauer E, Williams BA, Smidt H, Verstegen MW, Mosenthin R. Influence of the

gastrointestinal microbiota on development of the immune system in young animals. *Curr Issues Intest Microbiol* 2006; 7: 35-51.

Benno Y, Nakao H, Uchida K, Mitsuoka T. Impact of the advances in age on the gastrointestinal microflora of beagle dogs. *J Vet Med Sci* 1992; 54: 703-6.

Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, Hall KP, Evers DJ, Barnes CL, Bignell HR, Boutell JM, Bryant J, Carter RJ, Keira Cheetham R, Cox AJ, Ellis DJ, Flatbush MR, Gormley NA, Humphray SJ, Irving LJ, Karbelashvili MS, Kirk SM, Li H, Liu X, Maisinger KS, Murray LJ, Obradovic B, Ost T, Parkinson ML, Pratt MR, Rasolonjatovo IM, Reed MT, Rigatti R, Rodighiero C, Ross MT, Sabot A, Sankar SV, Scally A, Schroth GP, Smith ME, Smith VP, Spiridou A, Torrance PE, Tzonev SS, Vermaas EH, Walter K, Wu X, Zhang L, Alam MD, Anastasi C, Aniebo IC, Bailey DM, Bancarz IR, Banerjee S, Barbour SG, Baybayan PA, Benoit VA, Benson KF, Bevis C, Black PJ, Boodhun A, Brennan JS, Bridgham JA, Brown RC, Brown AA, Buermann DH, Bundu AA, Burrows JC, Carter NP, Castillo N, Chiara ECM, Chang S, Neil Cooley R, Crake NR, Dada OO, Diakoumakos KD, Dominguez-Fernandez B, Earnshaw DJ, Egbujor UC, Elmore DW, Etchin SS, Ewan MR, Fedurco M, Fraser LJ, Fuentes Fajardo KV, Scott Furey W, George D, Gietzen KJ, Goddard CP, Golda GS, Granieri PA, Green DE, Gustafson DL, Hansen NF, Harnish K, Haudenschild CD, Heyer NI, Hims MM, Ho JT, Horgan AM, Hoschler K, Hurwitz S, Ivanov DV, Johnson MQ, James T, Huw Jones TA, Kang GD, Kerelska TH, Kersey AD, Khrebtukova I, Kindwall AP, Kingsbury Z, Kokko-Gonzales PI, Kumar A, Laurent MA, Lawley CT, Lee SE, Lee X, Liao AK, Loch JA, Lok M, Luo S, Mammen RM, Martin JW, McCauley PG, McNitt P, Mehta P, Moon KW, Mullens JW, Newington T, Ning Z, Ling Ng B, Novo SM, O'Neill MJ, Osborne MA, Osnowski A, Ostadan O, Paraschos LL, Pickering L, Pike AC, Pike AC, Chris Pinkard D, Pliskin DP, Podhasky J, Quijano VJ, Racz C, Rae VH, Rawlings SR, Chiva Rodriguez A, Roe PM, Rogers J, Rogert Bacigalupo MC, Romanov N, Romieu A, Roth RK, Rourke NJ, Ruediger ST, Rusman E, Sanches-Kuiper RM, Schenker MR, Seoane JM, Shaw RJ, Shiver MK, Short SW, Sizto NL, Sluis JP, Smith MA, Ernest Sohna Sohna J, Spence EJ, Stevens K, Sutton N, Szajkowski L, Tregidgo CL, Turcatti G, Vandevondele S, Verhovsky Y, Virk SM, Wakelin S, Walcott GC, Wang J, Worsley GJ, Yan J, Yau L, Zuerlein M, Rogers J, Mullikin JC, Hurles ME,

McCooke NJ, West JS, Oaks FL, Lundberg PL, Klenerman D, Durbin R, Smith AJ. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 2008; 456: 53-9.

Benyacoub J, Czarnecki-Maulden GL, Cavadini C, Sauthier T, Anderson RE, Schiffrin EJ, von der Weid T. Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs. *J Nutr* 2003; 133: 1158-62.

Bermudez-Brito M, Plaza-Diaz J, Munoz-Quezada S, Gomez-Llorente C, Gil A. Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab* 2012; 61: 160-74.

Besselink MG, van Santvoort HC, Buskens E, Boermeester MA, van Goor H, Timmerman HM, Nieuwenhuijs VB, Bollen TL, van Ramshorst B, Witteman BJ, Rosman C, Ploeg RJ, Brink MA, Schaapherder AF, Dejong CH, Wahab PJ, van Laarhoven CJ, van der Harst E, van Eijck CH, Cuesta MA, Akkermans LM, Gooszen HG, Dutch Acute Pancreatitis Study G. Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2008; 371: 651-9.

Biagi G, Cipollini I, Pompei A, Zaghini G, Matteuzzi D. Effect of a *Lactobacillus animalis* strain on composition and metabolism of the intestinal microflora in adult dogs. *Vet Microbiol* 2007; 124: 160-5.

Blake AB, Guard BC, Honneffer JB, Lidbury JA, Steiner JM, Suchodolski JS. Altered microbiota, fecal lactate, and fecal bile acids in dogs with gastrointestinal disease. *PLoS ONE* 2019; 14: e0224454.

Brestoff JR, Artis D. Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. *Nat Immunol* 2013; 14: 676-84.

Brooks ME, Sterne M, Warrack GH. A re-assessment of the criteria used for type differentiation of *Clostridium perfringens*. *J. Pathol.* 1957; 74: 185-95.

Buffie CG, Pamer EG. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat Rev Immunol* 2013; 13: 790-801.

Busch K. Charakterisierung des endoskopischen und histologischen Bildes sowie der mikrobiellen Besiedelung des Darmes von Hunden mit akuter hämorrhagischer Diarrhoe. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2013.

Busch K, Suchodolski JS, Kuhner KA, Minamoto Y, Steiner JM, Mueller RS, Hartmann K, Unterer S. *Clostridium perfringens* enterotoxin and *Clostridium difficile* toxin A/B do not play a role in acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dogs. Vet Rec 2015; 176: 253.

Butto LF, Haller D. Dysbiosis in intestinal inflammation: Cause or consequence. Int J Med Microbiol 2016; 306: 302-9.

Bybee SN, Scorza AV, Lappin MR. Effect of the probiotic *Enterococcus faecium* SF68 on presence of diarrhea in cats and dogs housed in an animal shelter. J Vet Intern Med 2011; 25: 856-60.

Cave NJ, Marks SL, Kass PH, Melli AC, Brophy MA. Evaluation of a routine diagnostic fecal panel for dogs with diarrhea. J Am Vet Med Assoc 2002; 221: 52-9.

Chen X, Kokkotou EG, Mustafa N, Bhaskar KR, Sougioultzis S, O'Brien M, Pothoulakis C, Kelly CP. *Saccharomyces boulardii* inhibits ERK1/2 mitogen-activated protein kinase activation both *in vitro* and *in vivo* and protects against *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis. J Biol Chem 2006; 281: 24449-54.

Chen Y, Li Z, Tye KD, Luo H, Tang X, Liao Y, Wang D, Zhou J, Yang P, Li Y, Su Y, Xiao X. Probiotic Supplementation During Human Pregnancy Affects the Gut Microbiota and Immune Status. Front Cell Infect Microbiol 2019; 9: 254.

Cherrington CA, Hinton M, Pearson GR, Chopra I. Short-chain organic acids at pH 5.0 kill *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. without causing membrane perturbation. J Appl Bacteriol 1991; 70: 161-5.

Christen P, Jaussi R, Benoit R. Polymerase chain reaction PCR. In: Biochemie und

- Molekularbiologie: Eine Einführung in 40 Lerneinheiten. Springer, 2015; 505-506
- Clooney AG, Fouhy F, Sleator RD, A OD, Stanton C, Cotter PD, Claesson MJ. Comparing Apples and Oranges?: Next Generation Sequencing and Its Impact on Microbiome Analysis. PLoS ONE 2016; 11: e0148028.
- Coelho LP, Kultima JR, Costea PI, Fournier C, Pan Y, Czarnecki-Maulden G, Hayward MR, Forslund SK, Schmidt TSB, Descombes P, Jackson JR, Li Q, Bork P. Similarity of the dog and human gut microbiomes in gene content and response to diet. Microbiome 2018; 6: 72.
- Coelho MD, Coelho FA, de Mancilha IM. Probiotic therapy: a promising strategy for the control of canine hookworm. J Parasitol Res 2013; 2013: 430413.
- Corridoni D, Pastorelli L, Mattioli B, Locovei S, Ishikawa D, Arseneau KO, Chieppa M, Cominelli F, Pizarro TT. Probiotic bacteria regulate intestinal epithelial permeability in experimental ileitis by a TNF-dependent mechanism. PLoS ONE 2012; 7: e42067.
- Costa M, Weese JS. Methods and basic concepts for microbiota assessment. Vet J 2019; 249: 10-5.
- Costelloe C, Metcalfe C, Lovering A, Mant D, Hay AD. Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta-analysis. BMJ 2010; 340: c2096.
- Cox MJ, Huang YJ, Fujimura KE, Liu JT, McKean M, Boushey HA, Segal MR, Brodie EL, Cabana MD, Lynch SV. *Lactobacillus casei* abundance is associated with profound shifts in the infant gut microbiome. PLoS ONE 2010; 5: e8745.
- Cuiv PO, Klaassens ES, Durkin AS, Harkins DM, Foster L, McCorrison J, Torralba M, Nelson KE, Morrison M. Draft genome sequence of *Turicibacter sanguinis* PC909, isolated from human feces. J Bacteriol 2011; 193: 1288-9.
- D'Angelo S, Fracassi F, Bresciani F, Galuppi R, Diana A, Linta N, Bettini G, Morini

M, Pietra M. Effect of *Saccharomyces boulardii* in dog with chronic enteropathies: double-blinded, placebo-controlled study. Vet Rec 2018; 182: 258.

De Briyne N, Atkinson J, Pokludova L, Borriello SP. Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. Vet Rec 2014; 175: 325.

De Keersmaecker SC, Verhoeven TL, Desair J, Marchal K, Vanderleyden J, Nagy I. Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid. FEMS Microbiol Lett 2006; 259: 89-96.

De Laforcade AM, Freeman LM, Shaw SP, Brooks MB, Rozanski EA, Rush JE. Hemostatic changes in dogs with naturally occurring sepsis. J Vet Intern Med 2003; 17: 674-9.

Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. PLoS Biol 2008; 6: e280.

Di Giacinto C, Marinaro M, Sanchez M, Strober W, Boirivant M. Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF-beta-bearing regulatory cells. J Immunol 2005; 174: 3237-46.

Dobson A, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocin production: a probiotic trait? Appl Environ Microbiol 2012; 78: 1-6.

Dong H, Rowland I, Tuohy KM, Thomas LV, Yaqoob P. Selective effects of *Lactobacillus casei* Shirota on T cell activation, natural killer cell activity and cytokine production. Clin Exp Immunol 2010; 161: 378-88.

Dong H, Rowland I, Yaqoob P. Comparative effects of six probiotic strains on immune function *in vitro*. Br J Nutr 2012; 108: 459-70.

Ducluzeau R, Dubos F, Raibaud P, Abrams GD. Inhibition of *Clostridium perfringens* by an antibiotic substance produced by *Bacillus licheniformis* in the

digestive tract of gnotobiotic mice: effect on other bacteria from the digestive tract. *Antimicrob Agents Chemother* 1976; 9: 20-5.

Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005; 308: 1635-8.

Elli M, Zink R, Rytz A, Reniero R, Morelli L. Iron requirement of *Lactobacillus* spp. in completely chemically defined growth media. *J Appl Microbiol* 2000; 88: 695-703.

Erdmann C, Heilmann RM. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen beim Hund – diagnostische und therapeutische Aspekte. *Tierärztliche Praxis* 2017; 45: 317-27.

Ettinger SJ, Feldman EC, Cote E. Inflammatory Bowel Disease. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine* 8th edition. St. Louis, Missouri, USA, Elsevier, 2016; 3711

Ewaschuk J, Endersby R, Thiel D, Diaz H, Backer J, Ma M, Churchill T, Madsen K. Probiotic bacteria prevent hepatic damage and maintain colonic barrier function in a mouse model of sepsis. *Hepatology* 2007; 46: 841-50.

Fava F, Danese S. Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: friend of foe? *World J Gastroenterol* 2011; 17: 557-66.

Fenimore A, Martin L, Lappin MR. Evaluation of metronidazole with and without *Enterococcus faecium* SF68 in shelter dogs with diarrhea. *Top Companion Anim Med* 2017; 32: 100-3.

Francino MP. Antibiotics and the Human Gut Microbiome: Dysbioses and Accumulation of Resistances. *Front Microbiol* 2015; 6: 1543.

Fujiwara S, Hashiba H, Hirota T, Forstner JF. Inhibition of the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* Pb176 to human intestinal epithelial cell line

HCT-8 by an extracellular protein fraction containing BIF of *Bifidobacterium longum* SBT2928: suggestive evidence of blocking of the binding receptor gangliosylceramide on the cell surface. *Int J Food Microbiol* 2001; 67: 97-106.

Fukata T, Hadate Y, Baba E, Arakawa A. Influence of bacteria on *Clostridium perfringens* infections in young chickens. *Avian Dis* 1991; 35: 224-7.

Fukuda K, Ogawa M, Taniguchi H, Saito M. Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene. *J UOEH* 2016; 38: 223-32.

Fukushima Y, Kawata Y, Hara H, Terada A, Mitsuoka T. Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *Int J Food Microbiol* 1998; 42: 39-44.

Gagne JW, Wakshlag JJ, Simpson KW, Dowd SE, Latchman S, Brown DA, Brown K, Swanson KS, Fahey GC, Jr. Effects of a synbiotic on fecal quality, short-chain fatty acid concentrations, and the microbiome of healthy sled dogs. *BMC Vet Res* 2013; 9: 246.

Garcia-Mazcorro JF, Lanerie DJ, Dowd SE, Paddock CG, Grutzner N, Steiner JM, Ivanek R, Suchodolski JS. Effect of a multi-species synbiotic formulation on fecal bacterial microbiota of healthy cats and dogs as evaluated by pyrosequencing. *FEMS Microbiol Ecol* 2011; 78: 542-54.

Garcia-Mazcorro JF, Suchodolski JS, Jones KR, Clark-Price SC, Dowd SE, Minamoto Y, Markel M, Steiner JM, Dossin O. Effect of the proton pump inhibitor omeprazole on the gastrointestinal bacterial microbiota of healthy dogs. *FEMS Microbiol Ecol* 2012; 80: 624-36.

Garcia-Mazcorro JF, Minamoto Y. Gastrointestinal microorganisms in cats and dogs: a brief review. *Arch Med Vet* 2013; 45: 111-24.

Garrett WS, Lord GM, Punit S, Lugo-Villarino G, Mazmanian SK, Ito S, Glickman

JN, Glimcher LH. Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. *Cell* 2007; 131: 33-45.

Gasbarrini G, Montalto M. Structure and function of tight junctions. Role in intestinal barrier. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999; 31: 481-8.

Gavazza A, Rossi G, Lubas G, Cerquetella M, Minamoto Y, Suchodolski JS. Faecal microbiota in dogs with multicentric lymphoma. *Vet Comp Oncol* 2018; 16: E169-E75.

German AJ, Halladay LJ, Noble PJ. First-choice therapy for dogs presenting with diarrhoea in clinical practice. *Vet Rec* 2010; 167: 810-4.

Giaretta PR, Rech RR, Guard BC, Blake AB, Blick AK, Steiner JM, Lidbury JA, Cook AK, Hanifeh M, Spillmann T, Kilpinen S, Syrja P, Suchodolski JS. Comparison of intestinal expression of the apical sodium-dependent bile acid transporter between dogs with and without chronic inflammatory enteropathy. *J Vet Intern Med* 2018; 32:1918-26

Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, Scott K, Stanton C, Swanson KS, Cani PD, Verbeke K, Reid G. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017; 14: 491-502.

Gomez-Gallego C, Junnila J, Mannikko S, Hameenoja P, Valtonen E, Salminen S, Beasley S. A canine-specific probiotic product in treating acute or intermittent diarrhea in dogs: A double-blind placebo-controlled efficacy study. *Vet Microbiol* 2016; 197: 122-8.

Gong J, Si W, Forster RJ, Huang R, Yu H, Yin Y, Yang C, Han Y. 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. *FEMS Microbiol Ecol* 2007; 59: 147-57.

Gonzalez-Ortiz G, Castillejos L, Mallo JJ, Angels Calvo-Torras M, Dolores

Baucells M. Effects of dietary supplementation of *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 and *Enterococcus faecium* CECT 4515 in adult healthy dogs. Arch Anim Nutr 2013; 67: 406-15.

Gou S, Yang Z, Liu T, Wu H, Wang C. Use of probiotics in the treatment of severe acute pancreatitis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Crit Care 2014; 18: R57.

Gronvold AM, L'Abée-Lund TM, Sorum H, Skancke E, Yannarell AC, Mackie RI. Changes in fecal microbiota of healthy dogs administered amoxicillin. FEMS Microbiol Ecol 2010; 71: 313-26.

Guard BC. Microbial Characterization, Metabolomic Profiling, and Bile Acid Metabolism in Healthy Dogs and Dogs with Chronic Enteropathy. Dissertation. Texas A&M University, Texas, USA, 2017.

Guard BC, Barr JW, Reddivari L, Klemashevich C, Jayaraman A, Steiner JM, Vanamala J, Suchodolski JS. Characterization of microbial dysbiosis and metabolomic changes in dogs with acute diarrhea. PLoS ONE 2015; 10: e0127259.

Guard BC, Suchodolski JS. HORSE SPECIES SYMPOSIUM: Canine intestinal microbiology and metagenomics: From phylogeny to function. J Anim Sci 2016; 94: 2247-61.

Guard BC, Honneffer JB, Jergens AE, Jonika MM, Toresson L, Lawrence YA, Webb CB, Hill S, Lidbury JA, Steiner JM, Suchodolski JS. Longitudinal assessment of microbial dysbiosis, fecal unconjugated bile acid concentrations, and disease activity in dogs with steroid-responsive chronic inflammatory enteropathy. J Vet Intern Med 2019; 33: 1295-305.

Guo S, Liu D, Zhang B, Li Z, Li Y, Ding B, Guo Y. Two *Lactobacillus* Species Inhibit the Growth and alpha-Toxin Production of *Clostridium perfringens* and Induced Proinflammatory Factors in Chicken Intestinal Epithelial Cells *in Vitro*. Front Microbiol 2017; 8: 2081.

Hammami R, Fernandez B, Lacroix C, Fliss I. Anti-infective properties of bacteriocins: an update. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70: 2947-67.

Handl S, Dowd SE, Garcia-Mazcorro JF, Steiner JM, Suchodolski JS. Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. *FEMS Microbiol Ecol* 2011; 76: 301-10.

Hart AL, Lammers K, Brigidi P, Vitali B, Rizzello F, Gionchetti P, Campieri M, Kamm MA, Knight SC, Stagg AJ. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut* 2004; 53: 1602-9.

Hatzioanou D, Gherghisan-Filip C, Saalbach G, Horn N, Wegmann U, Duncan SH, Flint HJ, Mayer MJ, Narbad A. Discovery of a novel lantibiotic nisin O from *Blautia obeum* A2-162, isolated from the human gastrointestinal tract. *Microbiology* 2017; 163: 1292-305.

Hauptman JG, Walshaw R, Olivier NB. Evaluation of the sensitivity and specificity of diagnostic criteria for sepsis in dogs. *Vet Surg* 1997; 26: 393-7.

Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y. Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiol Immunol* 2002; 46: 535-48.

Heilmann RM, Guard MM, Steiner JM, Suchodolski JS, Unterer S. Fecal markers of inflammation, protein loss, and microbial changes in dogs with the acute hemorrhagic diarrhea syndrome (AHDS). *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2017; 27: 586-9.

Herstad HK, Nesheim BB, L'Abée-Lund T, Larsen S, Skancke E. Effects of a probiotic intervention in acute canine gastroenteritis--a controlled clinical trial. *J Small Anim Pract* 2010; 51: 34-8.

Hiergeist A, Glasner J, Reischl U, Gessner A. Analyses of Intestinal Microbiota: Culture versus Sequencing. *ILAR J* 2015; 56: 228-40.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 1993; 11: 1026-30.

Hiippala K, Jouhten H, Ronkainen A, Hartikainen A, Kainulainen V, Jalanka J, Satokari R. The Potential of Gut Commensals in Reinforcing Intestinal Barrier Function and Alleviating Inflammation. *Nutrients* 2018; 10

Hillmann B, Al-Ghalith GA, Shields-Cutler RR, Zhu Q, Gohl DM, Beckman KB, Knight R, Knights D. Evaluating the Information Content of Shallow Shotgun Metagenomics. *mSystems* 2018; 3

Hoffman JM, Margolis KG. Building community in the gut: a role for mucosal serotonin. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019; 17: 6-8.

Honneffer JB, Minamoto Y, Suchodolski JS. Microbiota alterations in acute and chronic gastrointestinal inflammation of cats and dogs. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 16489-97.

Honneffer JB, Steiner JM, Lidbury JA, Suchodolski JS. Variation of the microbiota and metabolome along the canine gastrointestinal tract. *Metabolomics* 2017; 13.3: 26.

Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 2012; 336: 1268-73.

Huson DH, Richter DC, Mitra S, Auch AF, Schuster SC. Methods for comparative metagenomics. *BMC Bioinformatics* 2009; 10 Suppl 1: S12.

Ibnou-Zekri N, Blum S, Schiffrin EJ, von der Weid T. Divergent patterns of colonization and immune response elicited from two intestinal *Lactobacillus* strains that display similar properties *in vitro*. *Infect Immun* 2003; 71: 428-36.

Igarashi H, Maeda S, Ohno K, Horigome A, Odamaki T, Tsujimoto H. Effect of oral administration of metronidazole or prednisolone on fecal microbiota in dogs.

PLoS ONE 2014; 9: e107909.

Isaiah A, Parambeth JC, Steiner JM, Lidbury JA, Suchodolski JS. The fecal microbiome of dogs with exocrine pancreatic insufficiency. *Anaerobe* 2017; 45: 50-58.

Israiloff J. Vergleich von Therapieformen der idiopathischen hämorrhagischen Gastroenteritis (HGE) beim Hund. Dissertation. Veterinärmedizinische Universität Wien, Österreich, 2009.

Jakobsson HE, Jernberg C, Andersson AF, Sjolund-Karlsson M, Jansson JK, Engstrand L. Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome. *PLoS ONE* 2010; 5: e9836.

Jenq RR, Taur Y, Devlin SM, Ponce DM, Goldberg JD, Ahr KF, Littmann ER, Ling L, Gobourne AC, Miller LC, Docampo MD, Peled JU, Arpaia N, Cross JR, Peets TK, Lumish MA, Shono Y, Dudakov JA, Poeck H, Hanash AM, Barker JN, Perales MA, Giralt SA, Pamer EG, van den Brink MR. Intestinal *Blautia* Is Associated with Reduced Death from Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015; 21: 1373-83.

Jernberg C, Lofmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology* 2010; 156: 3216-23.

Johnson CL, Versalovic J. The human microbiome and its potential importance to pediatrics. *Pediatrics* 2012; 129: 950-60.

Johnston BC, Ma SS, Goldenberg JZ, Thorlund K, Vandvik PO, Loeb M, Guyatt GH. Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2012; 157: 878-88.

Jones PH, Dawson S, Gaskell RM, Coyne KP, Tierney A, Setzkorn C, Radford AD, Noble PJ. Surveillance of diarrhoea in small animal practice through the Small Animal Veterinary Surveillance Network (SAVSNET). *Vet J* 2014; 201: 412-8.

Joossens M, Huys G, Cnockaert M, De Preter V, Verbeke K, Rutgeerts P, Vandamme P, Vermeire S. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut* 2011; 60: 631-7.

Kainulainen V, Tang Y, Spillmann T, Kilpinen S, Reunanen J, Saris PE, Satokari R. The canine isolate *Lactobacillus acidophilus* LAB20 adheres to intestinal epithelium and attenuates LPS-induced IL-8 secretion of enterocytes *in vitro*. *BMC Microbiol* 2015; 15: 4.

Kalliomaki M, Collado MC, Salminen S, Isolauri E. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 534-8.

Kamada N, Chen GY, Inohara N, Nunez G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol* 2013; 14: 685-90.

Kanasugi H, Hasegawa T, Goto Y, Ohtsuka H, Makimura S, Yamamoto T. Single administration of enterococcal preparation (FK-23) augments non-specific immune responses in healthy dogs. *Int J Immunopharmacol* 1997; 19: 655-9.

Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, Fukusumi S, Habata Y, Itoh T, Shintani Y, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem* 2003; 278: 9435-40.

Kelley R, Kerinne L, Mundell P, Hayek M. Effects of Varying Doses of a Probiotic Supplement Fed to Healthy Dogs Undergoing Kenneling Stress. *Intern J Appl Res Vet Med* 2012; 10: 205 - 16.

Kelley RL, Minikhiem D, Kiely B, O'Mahony L, O'Sullivan D, Boileau T, Park JS. Clinical benefits of probiotic canine-derived *Bifidobacterium animalis* strain AHC7 in dogs with acute idiopathic diarrhea. *Vet Ther* 2009; 10: 121-30.

Keyburn AL, Boyce JD, Vaz P, Bannam TL, Ford ME, Parker D, Di Rubbo A, Rood JI, Moore RJ. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis

caused by *Clostridium perfringens*. PLoS Pathog 2008; 4: e26.

Ki Cha B, Mun Jung, S., Hwan Choi, C., Song, I. WL, H., Joon Kim, H. . The effect of a multispecies probiotic mixture on the symptoms and fecal microbiota in diarrhea-dominant irritable bowel syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. J Clin Gastroenterol 2011: 220–7.

Kilian E, Suchodolski JS, Hartmann K, Mueller RS, Wess G, Unterer S. Long-term effects of canine parvovirus infection in dogs. PLoS ONE 2018; 13: e0192198.

Kim CH, Park J, Kim M. Gut microbiota-derived short-chain Fatty acids, T cells, and inflammation. Immune Netw 2014; 14: 277-88.

Kitahara M, Takamine F, Imamura T, Benno Y. *Clostridium hiranonis* sp. nov., a human intestinal bacterium with bile acid 7 α -dehydroxylating activity. Int J Syst Evol Microbiol 2001; 51: 39-44.

Klem F, Wadhwa A, Prokop LJ, Sundt WJ, Farrugia G, Camilleri M, Singh S, Grover M. Prevalence, Risk Factors, and Outcomes of Irritable Bowel Syndrome After Infectious Enteritis: A Systematic Review and Meta-analysis. Gastroenterology 2017; 152: 1042-54 e1.

Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Backhed F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. Cell 2016; 165: 1332-45.

Kummeling I, Stelma FF, Dagnelie PC, Snijders BE, Penders J, Huber M, van Ree R, van den Brandt PA, Thijs C. Early life exposure to antibiotics and the subsequent development of eczema, wheeze, and allergic sensitization in the first 2 years of life: the KOALA Birth Cohort Study. Pediatrics 2007; 119: e225-31.

Lagier JC, Armougom F, Million M, Hugon P, Pagnier I, Robert C, Bittar F, Fournous G, Gimenez G, Maraninchi M, Trape JF, Koonin EV, La Scola B, Raoult D. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. Clin Microbiol Infect 2012; 18: 1185-93.

Lau JT, Whelan FJ, Herath I, Lee CH, Collins SM, Bercik P, Surette MG. Capturing the diversity of the human gut microbiota through culture-enriched molecular profiling. *Genome Med* 2016; 8: 72.

Lawley B, Tannock GW. Analysis of 16S rRNA Gene Amplicon Sequences Using the QIIME Software Package. *Methods Mol Biol* 2017; 1537: 153-63.

LeBlanc JG, Laino JE, del Valle MJ, Vannini V, van Sinderen D, Taranto MP, de Valdez GF, de Giori GS, Sesma F. B-group vitamin production by lactic acid bacteria--current knowledge and potential applications. *J Appl Microbiol* 2011; 111: 1297-309.

Lederberg J, McCray AT. Ome Sweetomics--a Genealogical Treasury of Words. *The Scientist* 2001; 15: 8.

Leipig-Rudolph M, Busch K, Prescott JF, Mehdizadeh Gohari I, Leutenegger CM, Hermanns W, Wolf G, Hartmann K, Verspohl J, Unterer S. Intestinal lesions in dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome associated with *netF*-positive *Clostridium perfringens* type A. *J Vet Diagn Invest* 2018; 30: 495-503.

Leser TD, Amenuvor JZ, Jensen TK, Lindecrona RH, Boye M, Moller K. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 673-90.

Levy M, Kolodziejczyk AA, Thaïss CA, Elinav E. Dysbiosis and the immune system. *Nat Rev Immunol* 2017; 17: 219-32.

Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS, Schlegel ML, Tucker TA, Schrenzel MD, Knight R, Gordon JL. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* 2008; 320: 1647-51.

Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science* 1965; 147: 747-8.

Lindstrom M, Heikinheimo A, Lahti P, Korkeala H. Novel insights into the

epidemiology of *Clostridium perfringens* type A food poisoning. Food Microbiol 2011; 28: 192-8.

Liu C, Finegold SM, Song Y, Lawson PA. Reclassification of *Clostridium coccoides*, *Ruminococcus hansenii*, *Ruminococcus hydrogenotrophicus*, *Ruminococcus luti*, *Ruminococcus productus* and *Ruminococcus schinkii* as *Blautia coccoides* gen. nov., comb. nov., *Blautia hansenii* comb. nov., *Blautia hydrogenotrophica* comb. nov., *Blautia luti* comb. nov., *Blautia producta* comb. nov., *Blautia schinkii* comb. nov. and description of *Blautia wexlerae* sp. nov., isolated from human faeces. Int J Syst Evol Microbiol 2008; 58: 1896-902.

Luu TH, Michel C, Bard JM, Dravet F, Nazih H, Bobin-Dubigeon C. Intestinal Proportion of *Blautia* sp. is Associated with Clinical Stage and Histoprognotic Grade in Patients with Early-Stage Breast Cancer. Nutr Cancer 2017; 69: 267-75.

Mack DR, Ahrne S, Hyde L, Wei S, Hollingsworth MA. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. Gut 2003; 52: 827-33.

Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. Nat Rev Immunol 2004; 4: 478-85.

Majeed H, Gillor O, Kerr B, Riley MA. Competitive interactions in *Escherichia coli* populations: the role of bacteriocins. ISME J 2011; 5: 71-81.

Manchester AC, Webb CB, Blake AB, Sarwar F, Lidbury JA, Steiner JM, Suchodolski JS. Long-term impact of tylosin on fecal microbiota and fecal bile acids of healthy dogs. J Vet Intern Med 2019; 33: 2605-17.

Manninen TJ, Rinkinen ML, Beasley SS, Saris PE. Alteration of the canine small-intestinal lactic acid bacterium microbiota by feeding of potential probiotics. Appl Environ Microbiol 2006; 72: 6539-43.

Maqueda M, Sanchez-Hidalgo M, Fernandez M, Montalban-Lopez M, Valdivia E, Martinez-Bueno M. Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-

positive bacteria. FEMS Microbiol Rev 2008; 32: 2-22.

Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. Microbiome 2015; 3: 31.

Marcinakova M, Simonova M, Strompfova V, Laukova A. Oral application of *Enterococcus faecium* strain EE3 in healthy dogs. Folia Microbiol (Praha) 2006; 51: 239-42.

Markel M. Characterization of the Fecal Microbiota in Dogs with Chronic Enteropathies and Acute Hemorrhagic Diarrhea. Dissertation. Texas A&M University, Texas, USA, 2012.

Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. Bacteriological media. In: Clinical Veterinary Microbiology. Edinburgh, Elsevier, 2013; 17-47.

Marks SL, Kather EJ, Kass PH, Melli AC. Genotypic and phenotypic characterization of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in diarrheic and healthy dogs. J Vet Intern Med 2002; 16: 533-40.

Marks SL, Rankin SC, Byrne BA, Weese JS. Enteropathogenic bacteria in dogs and cats: diagnosis, epidemiology, treatment, and control. J Vet Intern Med 2011; 25: 1195-208.

Mehdizadeh Gohari I, Parreira VR, Nowell VJ, Nicholson VM, Oliphant K, Prescott JF. A novel pore-forming toxin in type A *Clostridium perfringens* is associated with both fatal canine hemorrhagic gastroenteritis and fatal foal necrotizing enterocolitis. PLoS ONE 2015; 10: e0122684.

Mehdizadeh Gohari I. Understanding Type A *Clostridium perfringens* in Foal Necrotizing Enteritis and Canine Acute Hemorrhagic Diarrhea. Diss. med. vet. 2018. University of Guelph.

Mentula S, Harmoinen J, Heikkila M, Westermarck E, Rautio M, Huovinen P, Kononen E. Comparison between cultured small-intestinal and fecal microbiotas in

beagle dogs. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 4169-75.

Metsala J, Lundqvist A, Virta LJ, Kaila M, Gissler M, Virtanen SM. Prenatal and post-natal exposure to antibiotics and risk of asthma in childhood. *Clin Exp Allergy* 2015; 45: 137-45.

Middelbos IS, Vester Boler BM, Qu A, White BA, Swanson KS, Fahey GC, Jr. Phylogenetic characterization of fecal microbial communities of dogs fed diets with or without supplemental dietary fiber using 454 pyrosequencing. *PLoS ONE* 2010; 5: e9768.

Minamoto Y, Otoni CC, Steelman SM, Buyukleblebici O, Steiner JM, Jergens AE, Suchodolski JS. Alteration of the fecal microbiota and serum metabolite profiles in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Gut Microbes* 2014a: 1-15.

Minamoto Y, Dhanani N, Markel ME, Steiner JM, Suchodolski JS. Prevalence of *Clostridium perfringens*, *Clostridium perfringens* enterotoxin and dysbiosis in fecal samples of dogs with diarrhea. *Vet Microbiol* 2014b; 174: 463-73.

Minamoto Y, Minamoto T, Isaiah A, Sattasathuchana P, Buono A, Rangachari VR, McNeely IH, Lidbury J, Steiner JM, Suchodolski JS. Fecal short-chain fatty acid concentrations and dysbiosis in dogs with chronic enteropathy. *J Vet Intern Med* 2019; 33: 1608-18.

Momose Y, Hirayama K, Itoh K. Competition for proline between indigenous *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in gnotobiotic mice associated with infant intestinal microbiota and its contribution to the colonization resistance against *E. coli* O157:H7. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2008; 94: 165-71.

Morozova O, Marra MA. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics* 2008; 92: 255-64.

Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 1998; 24: 954-8, 60, 62.

Mortier F, Strohmeyer K, Hartmann K, Unterer S. Acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dogs: 108 cases. *Vet Rec* 2015; 176: 627.

Moter A, Gobel UB. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microbiol Methods* 2000; 41: 85-112.

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-50.

Nagpal R, Wang S, Ahmadi S, Hayes J, Gagliano J, Subashchandrabose S, Kitzman DW, Becton T, Read R, Yadav H. Human-origin probiotic cocktail increases short-chain fatty acid production via modulation of mice and human gut microbiome. *Sci Rep* 2018; 8: 12649.

Nesser JR, Granato D, Rouvet M, Servin A, Teneberg S, Karlsson KA. *Lactobacillus johnsonii* La1 shares carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria. *Glycobiology* 2000: 1193–9.

Oelschlaeger TA. Mechanisms of probiotic actions - A review. *Int J Med Microbiol* 2010; 300: 57-62.

Olsen GJ, Lane DJ, Giovannoni SJ, Pace NR, Stahl DA. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu Rev Microbiol* 1986; 40: 337-65.

Olson E, M. HJ, Waddle M, Steiner JM, Suchodolski J, Gaschen F. Evaluation of the effects of a 2-week treatment with metronidazole on the fecal microbiome of healthy dogs. *J Vet Intern Med* 2015; 29: 1185.

Ortiz V, Klein L, Channell S, Simpson B, Wright B, Edwards C, Gilbert R, Day R, Caddy SL. Evaluating the effect of metronidazole plus amoxicillin-clavulanate versus amoxicillin-clavulanate alone in canine haemorrhagic diarrhoea: a randomised controlled trial in primary care practice. *J Small Anim Pract* 2018; 59: 398-403.

Packey CD, Sartor RB. Commensal bacteria, traditional and opportunistic pathogens, dysbiosis and bacterial killing in inflammatory bowel diseases. *Curr Opin Infect Dis* 2009; 22: 292-301.

Park JH, Um JI, Lee BJ, Goh JS, Park SY, Kim WS, Kim PH. Encapsulated *Bifidobacterium bifidum* potentiates intestinal IgA production. *Cell Immunol* 2002; 219: 22-7.

Pascher M, Hellweg P, Khol-Parisini A, Zentek J. Effects of a probiotic *Lactobacillus acidophilus* strain on feed tolerance in dogs with non-specific dietary sensitivity. *Arch Anim Nutr* 2008; 62: 107-16.

Pedersen C, Lefevre S, Peters V, Patterson M, Ghatei MA, Morgan LM, Frost GS. Gut hormone release and appetite regulation in healthy non-obese participants following oligofructose intake. A dose-escalation study. *Appetite* 2013; 66: 44-53.

Ploger S, Stumpff F, Penner GB, Schulzke JD, Gabel G, Martens H, Shen Z, Gunzel D, Aschenbach JR. Microbial butyrate and its role for barrier function in the gastrointestinal tract. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1258: 52-9.

Preidis GA, Saulnier DM, Blutt SE, Mistretta TA, Riehle KP, Major AM, Venable SF, Finegold MJ, Petrosino JF, Conner ME, Versalovic J. Probiotics stimulate enterocyte migration and microbial diversity in the neonatal mouse intestine. *FASEB J* 2012; 26: 1960-9.

Rasti B, Selemat J, Shuhaimi M, Neteghi L, Yik Yee L, Tajabadi N, Meimandipour A, Manap YA. Inhibition of *Clostridium scindens* and *Clostridium hiranonis* growth by *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4 in simulated colonic pH. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 2013; 11: 127-31.

Rinkinen M, Jalava K, Westermarck E, Salminen S, Ouwehand AC. Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization? *Vet Microbiol* 2003; 92: 111-9.

Rodgers NJ, Swick RA, Geier MS, Moore RJ, Choct M, Wu SB. A Multifactorial

Analysis of the Extent to Which *Eimeria* and Fishmeal Predispose Broiler Chickens to Necrotic Enteritis. Avian Dis 2015; 59: 38-45.

Rödler F. Akutes hämorrhagisches Diarrhoesyndrom beim Hund – ein Überblick. Kleintier konkret 2016; 2: 10-6.

Rose L, Rose J, Gosling S, Holmes M. Efficacy of a Probiotic-Prebiotic Supplement on Incidence of Diarrhea in a Dog Shelter: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. J Vet Intern Med 2017; 31: 377-82.

Rossi G, Pengo G, Caldin M, Palumbo Piccionello A, Steiner JM, Cohen ND, Jergens AE, Suchodolski JS. Comparison of Microbiological, Histological, and Immunomodulatory Parameters in Response to Treatment with Either Combination Therapy with Prednisone and Metronidazole or Probiotic VSL#3 Strains in Dogs with Idiopathic Inflammatory Bowel Disease. PLoS ONE 2014; 9: e94699.

Rossi G, Cerquetella M, Scarpona S, Pengo G, Fettucciari K, Bassotti G, Jergens AE, Suchodolski JS. Effects of probiotic bacteria on mucosal polyamines levels in dogs with IBD and colonic polyps: a preliminary study. Benef Microbes 2018; 9: 247-55.

Rossi G, Pengo G, Caldin M, Palumbo Piccionello A, Steiner JM, Cohen ND, Jergens AE, Suchodolski JS. Comparison of microbiological, histological, and immunomodulatory parameters in response to treatment with either combination therapy with prednisone and metronidazole or probiotic VSL#3 strains in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. PLoS ONE 2014; 9: e94699.

Roszak DB, Grimes DJ, Colwell RR. Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. Can J Microbiol 1984; 30: 334-8.

Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I, Tuohy K. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. Eur J Nutr 2018; 57: 1-24.

Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Matto J, Mattila-Sandholm T. Probiotic

bacteria: safety, functional and technological properties. J Biotechnol 2000; 84: 197-215.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 1977; 74: 5463-7.

Sarwar F, Ziese AL, Werner M, Busch K, Minamoto Y, Blake A, Lidbury JA, Steiner JM, Unterer S, Suchodolski JS (2018) Prevalence of *Clostridium perfringens* Encoding *netF* Gene in Dogs with Acute and Chronic Gastrointestinal Diseases. Proceedings American College of Veterinary Internal Medicine Forum 2018. Seattle, WA, USA; 628

Sauter SN, Allenspach K, Gaschen F, Grone A, Ontsouka E, Blum JW. Cytokine expression in an *ex vivo* culture system of duodenal samples from dogs with chronic enteropathies: modulation by probiotic bacteria. Domest Anim Endocrinol 2005; 29: 605-22.

Sauter SN, Benyacoub J, Allenspach K, Gaschen F, Ontsouka E, Reuteler G, Cavadini C, Knorr R, Blum JW. Effects of probiotic bacteria in dogs with food responsive diarrhoea treated with an elimination diet. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) 2006; 90: 269-77.

Schloss PD. Reintroducing mothur: 10 Years Later. Appl Environ Microbiol 2020; 86

Schmidt M, Unterer S, Suchodolski JS, Honneffer JB, Guard BC, Lidbury JA, Steiner JM, Fritz J, Kolle P. The fecal microbiome and metabolome differs between dogs fed Bones and Raw Food (BARF) diets and dogs fed commercial diets. PLoS ONE 2018; 13: e0201279.

Schmitz S, Glanemann B, Garden OA, Brooks H, Chang YM, Werling D, Allenspach K. A prospective, randomized, blinded, placebo-controlled pilot study on the effect of *Enterococcus faecium* on clinical activity and intestinal gene expression in canine food-responsive chronic enteropathy. J Vet Intern Med 2015; 29: 533-43.

Schmitz S, Suchodolski J. Understanding the canine intestinal microbiota and its modification by pro-, pre- and synbiotics - what is the evidence? Vet Med Sci 2016; 2: 71-94.

Schrezenmeir J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition. Am J Clin Nutr 2001; 73: 361S-4S.

Siggers RH, Siggers J, Boye M, Thymann T, Molbak L, Leser T, Jensen BB, Sangild PT. Early administration of probiotics alters bacterial colonization and limits diet-induced gut dysfunction and severity of necrotizing enterocolitis in preterm pigs. J Nutr 2008; 138: 1437-44.

Simpson JM, Martineau B, Jones WE, Ballam JM, Mackie RI. Characterization of fecal bacterial populations in canines: effects of age, breed and dietary fiber. Microb Ecol 2002; 44: 186-97.

Simpson KW, Dogan B, Rishniw M, Goldstein RE, Klaessig S, McDonough PL, German AJ, Yates RM, Russell DG, Johnson SE, Berg DE, Harel J, Bruant G, McDonough SP, Schukken YH. Adherent and invasive *Escherichia coli* is associated with granulomatous colitis in boxer dogs. Infect Immun 2006; 74: 4778-92.

Simpson KW, Rishniw M, Bellosa M, Liotta J, Lucio A, Baumgart M, Czarnecki-Maulden G, Benyacoub J, Bowman D. Influence of *Enterococcus faecium* SF68 probiotic on giardiasis in dogs. J Vet Intern Med 2009; 23: 476-81.

Simpson KW, Jergens AE. Pitfalls and progress in the diagnosis and management of canine inflammatory bowel disease. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2011; 41: 381-98.

Sinan Aktas M, Kazim Borku M, Ozkanlar Y. Efficacy of *Saccharomyces boulardii* as a probiotic in dogs with lincomycin induced diarrhoea. Bulletin- Veterinary Institute in Pulawy 2007; 51: 365-9.

Sindern N, Suchodolski JS, Leutenegger CM, Mehdizadeh Gohari I, Prescott JF, Proksch AL, Mueller RS, Busch K, Unterer S. Prevalence of *Clostridium perfringens* *netE* and *netF* toxin genes in the feces of dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome. J Vet Intern Med 2019; 33: 100-5.

Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly YM, Glickman JN, Garrett WS. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. Science 2013; 341: 569-73.

Sokolow SH, Rand C, Marks SL, Drazenovich NL, Kather EJ, Foley JE. Epidemiologic evaluation of diarrhea in dogs in an animal shelter. Am J Vet Res 2005; 66: 1018-24.

Songer JG. Clostridial enteric diseases of domestic animals. Clin Microbiol Rev 1996; 9: 216-34.

Sotoudegan F, Daniali M, Hassani S, Nikfar S, Abdollahi M. Reappraisal of probiotics' safety in human. Food Chem Toxicol 2019; 129: 22-9.

Stanley D, Wu SB, Rodgers N, Swick RA, Moore RJ. Differential responses of cecal microbiota to fishmeal, *Eimeria* and *Clostridium perfringens* in a necrotic enteritis challenge model in chickens. PLoS ONE 2014; 9: e104739.

Strompfova V, Marcinakova M, Simonova M, Bogovic-Matijasac B, Laukova A. Application of potential probiotic *Lactobacillus fermentum* AD1 strain in healthy dogs. Anaerobe 2006; 12: 75-9.

Stroupe C, Pendley J, Isang E, Helms B. Persistent bacteremia secondary to delayed identification of *Lactobacillus* in the setting of mitral valve endocarditis. IDCases 2017; 10: 132-4.

Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, Dore J. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. Appl Environ Microbiol 1999; 65: 4799-807.

Suchodolski J, Olson E, Honneffer J, Guard B, Blake A, Alshawaqfeh M, Steiner JM, Barr J, Gaschen F, . Effects of a hydrolyzed protein diet and metronidazole on the fecal microbiome and metabolome in healthy dogs. *J Vet Intern Med* 2016; 30: 1455.

Suchodolski JS, Ruaux CG, Steiner JM, Fetz K, Williams DA. Application of molecular fingerprinting for qualitative assessment of small-intestinal bacterial diversity in dogs. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4702-8.

Suchodolski JS, Ruaux CG, Steiner JM, Fetz K, Williams DA. Assessment of the qualitative variation in bacterial microflora among compartments of the intestinal tract of dogs by use of a molecular fingerprinting technique. *Am J Vet Res* 2005; 66: 1556-62.

Suchodolski JS, Camacho J, Steiner JM. Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis. *FEMS Microbiol Ecol* 2008; 66: 567-78.

Suchodolski JS, Dowd SE, Westermarck E, Steiner JM, Wolcott RD, Spillmann T, Harmoinen JA. The effect of the macrolide antibiotic tylosin on microbial diversity in the canine small intestine as demonstrated by massive parallel 16S rRNA gene sequencing. *BMC Microbiol* 2009; 9: 210.

Suchodolski JS, Xenoulis PG, Paddock CG, Steiner JM, Jergens AE. Molecular analysis of the bacterial microbiota in duodenal biopsies from dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Vet Microbiol* 2010; 142: 394-400.

Suchodolski JS. Intestinal microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2011; 41: 261-72.

Suchodolski JS, Dowd SE, Wilke V, Steiner JM, Jergens AE. 16S rRNA gene pyrosequencing reveals bacterial dysbiosis in the duodenum of dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *PLoS ONE* 2012a; 7: e39333.

Suchodolski JS, Markel ME, Garcia-Mazcorro JF, Unterer S, Heilmann RM, Dowd SE, Kachroo P, Ivanov I, Minamoto Y, Dillman EM. The fecal microbiome in dogs with acute diarrhea and idiopathic inflammatory bowel disease. PLoS ONE 2012b; 7: e51907.

Suchodolski JS. Diagnosis and interpretation of intestinal dysbiosis in dogs and cats. Vet J 2016; 215: 30-7.

Suez J, Zmora N, Zilberman-Schapira G, Mor U, Dori-Bachash M, Bashiares S, Zur M, Regev-Lehavi D, Ben-Zeev Brik R, Federici S, Horn M, Cohen Y, Moor AE, Zeevi D, Korem T, Kotler E, Harmelin A, Itzkovitz S, Maharshak N, Shibolet O, Pevsner-Fischer M, Shapiro H, Sharon I, Halpern Z, Segal E, Elinav E. Post-Antibiotic Gut Mucosal Microbiome Reconstitution Is Impaired by Probiotics and Improved by Autologous FMT. Cell 2018; 174: 1406-23 e16.

Swanson KS, Dowd SE, Suchodolski JS, Middelbos IS, Vester BM, Barry KA, Nelson KE, Torralba M, Henrissat B, Coutinho PM, Cann IK, White BA, Fahey GC, Jr. Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. ISME J 2011; 5: 639-49.

Sykes R. The 2009 Garrod lecture: the evolution of antimicrobial resistance: a Darwinian perspective. J Antimicrob Chemother 2010; 65: 1842-52.

Thomas CM, Versalovic J. Probiotics-host communication: Modulation of signaling pathways in the intestine. Gut Microbes 2010; 1: 148-63.

Tilg H, Moschen AR. Microbiota and diabetes: an evolving relationship. Gut 2014; 63: 1513-21.

Tizard IR, Jones SW. The Microbiota Regulates Immunity and Immunologic Diseases in Dogs and Cats. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2018; 48: 307-22.

Torres-Henderson C, S. S, Suchodolski J, Lappin MR. Effect of *Enterococcus Faecium* Strain SF68 on Gastrointestinal Signs and Fecal Microbiome in Cats

Administered Amoxicillin-Clavulanate. Top Companion Anim Med 2017; 32: 104-8.

Touyama M, Jin JS, Kibe R, Hayashi H, Benno Y. Quantification of *Blautia wexlerae* and *Blautia luti* in human faeces by real-time PCR using specific primers. Benef Microbes 2015; 6: 583-90.

Trauner M, Claudel T, Fickert P, Moustafa T, Wagner M. Bile acids as regulators of hepatic lipid and glucose metabolism. Dig Dis 2010; 28: 220-4.

Tringe SG, Hugenholtz P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. Curr Opin Microbiol 2008; 11: 442-6.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. Nature 2007; 449: 804-10.

Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R, Gordon JI. A core gut microbiome in obese and lean twins. Nature 2009; 457: 480-4.

Ungaro R, Bernstein CN, Gearry R, Hviid A, Kolho KL, Kronman MP, Shaw S, Van Kruiningen H, Colombel JF, Atreja A. Antibiotics associated with increased risk of new-onset Crohn's disease but not ulcerative colitis: a meta-analysis. Am J Gastroenterol 2014; 109: 1728-38.

Unterer S, Hartmann K. Akuter blutiger Durchfall beim Hund - Ursachen und diagnostische Aufarbeitung. Tierärztliche Praxis 2009; 37: 261-8.

Unterer S, Strohmeyer K, Kruse BD, Sauter-Louis C, Hartmann K. Treatment of aseptic dogs with hemorrhagic gastroenteritis with amoxicillin/clavulanic acid: a prospective blinded study. J Vet Intern Med 2011; 25: 973-9.

Unterer S, Busch K, Leipzig M, Hermanns W, Wolf G, Straubinger RK, Mueller RS, Hartmann K. Endoscopically visualized lesions, histologic findings, and bacterial

invasion in the gastrointestinal mucosa of dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome. J Vet Intern Med 2014; 28: 52-8.

Unterer S, Lechner E, Mueller RS, Wolf G, Straubinger RK, Schulz BS, Hartmann K. Prospective study of bacteraemia in acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dogs. Vet Rec 2015; 176: 309.

Vahjen W, Manner K. The effect of a probiotic *Enterococcus faecium* product in diets of healthy dogs on bacteriological counts of *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and *Clostridium* spp. in faeces. Arch Tierernahr 2003; 57: 229-33.

Vazquez-Baeza Y, Hyde ER, Suchodolski JS, Knight R. Dog and human inflammatory bowel disease rely on overlapping yet distinct dysbiosis networks. Nat Microbiol 2016; 1: 16177.

Verna EC, Lucak S. Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? Therap Adv Gastroenterol 2010; 3: 307-19.

Wang HB, Wang PY, Wang X, Wan YL, Liu YC. Butyrate enhances intestinal epithelial barrier function via up-regulation of tight junction protein Claudin-1 transcription. Dig Dis Sci 2012; 57: 3126-35.

Washabau RJ, Day MJ, Willard MD, Hall EJ, Jergens AE, Mansell J, Minami T, Bilzer TW, Group WIGS. Endoscopic, biopsy, and histopathologic guidelines for the evaluation of gastrointestinal inflammation in companion animals. J Vet Intern Med 2010; 24: 10-26.

Weese JS, Staempfli HR, Prescott JF, Kruth SA, Greenwood SJ, Weese HE. The roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in diarrhea in dogs. J Vet Intern Med 2001; 15: 374-8.

Weese JS, Anderson ME. Preliminary evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG, a potential probiotic in dogs. Can Vet J 2002; 43: 771-4.

Westermarck E, Skrzypczak T, Harmoinen J, Steiner JM, Ruaux CG, Williams DA,

Eerola E, Sundback P, Rinkinen M. Tylosin-responsive chronic diarrhea in dogs. *J Vet Intern Med* 2005; 19: 177-86.

White R, Atherly T, Guard B, Rossi G, Wang C, Mosher C, Webb C, Hill S, Ackermann M, Sciabarra P, Allenspach K, Suchodolski J, Jergens AE. Randomized, controlled trial evaluating the effect of multi-strain probiotic on the mucosal microbiota in canine idiopathic inflammatory bowel disease. *Gut Microbes* 2017; 8: 451-66.

Whittemore JC, Moyers TD, Price JM. Randomized, controlled, crossover trial of prevention of antibiotic-induced gastrointestinal signs using a synbiotic mixture in healthy research dogs. *J Vet Intern Med* 2019; 33: 1619-26.

WHO/FAO (2002) Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Ed FAO/WHO, London, Ontario, Canada

Wiest R, Rath HC. Gastrointestinal disorders of the critically ill. Bacterial translocation in the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17: 397-425.

Wu SB, Rodgers N, Choct M. Optimized necrotic enteritis model producing clinical and subclinical infection of *Clostridium perfringens* in broiler chickens. *Avian Dis* 2010; 54: 1058-65.

Xenoulis PG, Palculict B, Allenspach K, Steiner JM, Van House AM, Suchodolski JS. Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease. *FEMS Microbiol Ecol* 2008; 66: 579-89.

Yang WY, Lee YJ, Lu HY, Branton SL, Chou CH, Wang C. The *netB*-positive *Clostridium perfringens* in the experimental induction of necrotic enteritis with or without predisposing factors. *Poult Sci* 2019; 98: 5297-306.

Zhong Y, Nyman M, Fak F. Modulation of gut microbiota in rats fed high-fat diets by processing whole-grain barley to barley malt. *Mol Nutr Food Res* 2015; 59: 2066-76.

VIII. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Stefan Unterer. Dank dir, Stefan, durfte ich in den letzten Jahren unglaublich viel lernen und mit deiner motivierenden Art hat die Zeit als Doktorandin und wissenschaftliche Hilfskraft an der Medizinischen Kleintierklinik wirklich Spaß gemacht. Danke für deine Unterstützung und Förderung zu jeder Zeit, dies weiß ich sehr zu schätzen. Du bist wirklich ein super Doktorvater!

Mein besonderer Dank gilt außerdem Prof. Dr. Jan Suchodolski. Lieber Jan, danke, dass du mir mit deinem Fachwissen jederzeit unterstützend zur Seite standst. Auch neben der Doktorarbeit durfte ich dank dir sehr viel lernen. Ich bin für all die Förderung, die ich in dieser Zeit von dir erfahren habe, und die Möglichkeiten, die sich dadurch aufgetan haben, wahnsinnig dankbar.

Weiterhin danke ich herzlich den Mitarbeitern des GI-Labs der Texas A&M University für die schnelle Bearbeitung der Proben, sowie die allzeit rasche Beantwortung offener Fragen.

Meinen fantastischen Freundinnen und Freunden möchte ich von Herzen danken. Danke, dass wir immer so viel Spaß miteinander haben und ihr euch wacker meine Nörgeleien angehört habt. Ohne euch wäre sicherlich nichts voran gegangen. Ich habe euch so sehr lieb und Freunde, wie ihr sie seid, kann man sich nur wünschen!

Mein Herz gehört außerdem meinen tierischen Begleitern Charly, Tigger, Hubert und Sheepy, die dazu beigetragen haben, den tiermedizinischen Pfad einzuschlagen. Ich habe euch so lieb und danke euch für alle flauschigen Momente.

Meinem geliebten Freund Andi danke ich aus tiefstem Herzen. Le and, danke für deine Geduld, deine Unterstützung und deine Liebe! Du hast mir geholfen öfter einmal durchzuatmen und festzustellen, dass die Doktorarbeit nicht alles ist im Leben. Tausend Küsse!

Mein tiefster Dank gilt meiner Familie, dafür, dass sie mir all dies bedingungslos ermöglicht hat und jederzeit seelischen Beistand geleistet hat. Nur dank euch, Papa, Mama, Bali, Oma und Opa, Ferdi und Tom, Oma Käthe, Dörte und Jörg bin ich heute dort wo ich bin. Danke, dass ihr immer an mich glaubt! Dafür bin ich euch wirklich auf ewig dankbar. Ich habe euch über alles lieb!